

Forschungszentrum Jülich



Institut für Biotechnologie

***Biochemische und molekularbiologische
Charakterisierung des Riboflavintransports
in Ashbya gossypii***

Carola Förster

Jül-3626

***Biochemische und molekularbiologische
Charakterisierung des Riboflavintransports
in Ashbya gossypii***

Carola Förster

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3626
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3626
D89 (Diss. Universität Hannover)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Abstract

The filamentous fungus *Ashbya gossypii* is used for industrial riboflavin (vitamin B₂) production. Biosynthesis, regulation and production parameters have been studied thoroughly in the past, resulting in well established fermentation processes with a reported maximum yield of 15 g/l. The present work addresses now the still outstanding analysis of riboflavin transport processes in *A. gossypii*. On the basis of this characterization, producing strains with an improved riboflavin excretion were developed.

During fed-batch fermentation processes as well as in its natural habitat, *A. gossypii* frequently encounters hyperosmotic stress which leads to reduced riboflavin oversynthesis. The osmoadaptation mechanisms of *A. gossypii* were investigated, hereby distinguishing between halo- and osmotolerance by exposure to NaCl and mannitol stress. Growth and ultrastructure of differently treated cells were compared and the intracellular contents of compatible solutes and inorganic ions were quantified. Glycerol was found to be the predominant compatible solute in *Ashbya gossypii*, accumulation of inorganic ions could not be detected. Measurement of glycerol uptake under isosmotic conditions as well as upon hyperosmotic stress revealed the existence of a highly active glycerol uptake system, which however was down-regulated under hyperosmotic stress. Investigation of glycerol biosynthesis by measuring glycerol-3-phosphate-dehydrogenase activity under hyperosmotic conditions indicated that accumulation of glycerol in *A. gossypii* is solely due to biosynthesis.

Riboflavin uptake and excretion at the plasma membrane could be characterized to be mediated by two separate carrier systems. Hereby, highly active export opposes uptake of very low activity, rendering re-uptake of excreted riboflavin negligible for netto-excretion. Riboflavin production by *A. gossypii* starts in the late growth phase when septa are formed in the hyphae and vacuoles become visible. Vacuoles begin to pool big amounts of riboflavin. As the vacuolar compartmentation of metabolites in general plays a major role in the regulation of metabolism in fungi, determination of riboflavin fluxes across the tonoplast was crucial for understanding riboflavin transport in *A. gossypii*. For this purpose, two different approaches to prepare and characterise vacuoles from the filamentous fungus were developed, i.e. the isolation of vacuoles from hyphal cells and the controlled permeabilisation of the plasma membrane. Furthermore, a purification procedure for the vacuolar H⁺-ATPase of *A. gossypii* was established to characterise its subunit composition, hydrolytic activity and sensitivity against specific inhibitors. Using these cell biological tools, dependence of vacuolar riboflavin accumulation on the activity of the V-ATPase could be proven. By transport assays, dynamic compartmentation of riboflavin between cytosol and vacuole was shown to be based on active, ATPase-dependent accumulation and an energy-independent efflux mechanism. By inhibition of the V-ATPase with the specific inhibitor concanamycin A, effective redirection of vacuolar riboflavin contents into the growth medium was achieved. In order to construct new strains with impaired vacuolar riboflavin accumulation, the vacuolar ATPase subunit A structural gene *VMA1* of *A. gossypii* was cloned and disrupted. Cloning was achieved by PCR using degenerated oligonucleotide primers derived from conserved sequences of the Vma1 proteins from yeast and filamentous fungi. Disruption of the *AgVMA1* gene led to complete excretion of riboflavin into the medium instead of retention in the vacuolar compartment, as observed under concanamycin A inhibition. Interestingly, in contrast to *S. cerevisiae* where disruption of the *VMA1* gene is conditionally lethal and to *N. crassa*, where viable disruptants could not be isolated, disruption of the *VMA1* gene in *A. gossypii* did not cause a lethal phenotype.

The new disruptant strains only show significant riboflavin transmembrane fluxes via the plasma membrane export carrier system. They could therefore be apt for screening on the plasma membrane export carrier to achieve further improvement of riboflavin excretion in the future. As an alternative strategy to impair vacuolar riboflavin accumulation, the 2-dimensional separation of vacuolar membrane proteins via 2-D-gelelektrophoresis was established as a screening method on the vacuolar riboflavin uptake protein via spot matching analysis between strains which differ in their vacuolar riboflavin accumulation.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
1.	Mikrobiologischer Hintergrund.....	1
2.	Biotechnologische Riboflavinproduktion mit <i>A. gossypii</i>	2
3.	Transport von Metaboliten in Hefen und filamentösen Pilzen	4
4.	Die vakuoläre H ⁺ -ATPase	8
5.	Vakuoläre Akkumulation von Metaboliten in Pilzen und Hefen.....	11
6.	Osmoregulation	12
II.	Material und Methoden	14
1.	Chemikalien	14
2.	Verwendete Stämme und Plasmide.....	15
3.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	17
4.	Biochemische und zellbiologische Methoden.....	19
4.1.	Silikonölzentrifugation.....	19
4.2.	Bestimmung des Zellinnenvolumens von <i>A. gossypii</i>	19
4.3.	Herstellung von Rohextrakten von <i>A. gossypii</i>	20
4.4.	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten von Hexokinase, Fumarase und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	20
4.5.	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der α -Mannosidase	21
4.6.	Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der V-ATPase	21
4.7.	Herstellung von Protoplasten aus Hyphen von <i>A. gossypii</i>	22
4.8.	Isolierung der Vakuolen aus Hyphen von <i>A. gossypii</i>	22
4.9.	Selektive Permeabilisierung der Plasmamembran von <i>A. gossypii</i>	22
4.10.	Riboflavin-Effluxmessungen	23
4.11.	Bestimmung von Aufnahmeraten.....	23
4.12.	Quantitative Bestimmung von Biotrockenmasse und Riboflavin.....	24
4.13.	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	25
4.14.	Bestimmung der Osmolalität.....	25
4.15.	Analyse anorganischer Ionen.....	25
4.16.	Bestimmung von Adeninnukleotiden	25
5.	Proteinchemische Methoden.....	26
5.1.	Präparation von Vakuolenmembranen.....	26
5.2.	Aufreinigung der vakuolären H ⁺ -ATPase	27
5.3.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	28
5.4.	Färbung der Gele und Auswertung	29
6.	Molekularbiologische Methoden.....	29
6.1.	Sporenisolierung aus <i>A. gossypii</i>	29
6.2.	Präparation und Reinigung von DNA.....	30
6.3.	Analyse, Rekombination und Modifikation von DNA	32
6.4.	Transformationstechniken	33

INHALTSVERZEICHNIS

6.5. Southern-Blot-Analyse.....	34
6.6. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	36
6.7. DNA-Sequenzanalyse	37
7. ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	37
8. Mikroskopische Techniken	38
8.1. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	38
8.2. Elektronenmikroskopie	38
 III. Ergebnisse	39
1. Biochemische und physiologische Adaptation von <i>A. gossypii</i> an hyperosmotischen Streß	39
1.1. Effekte von hyperosmotischem Streß auf Wachstum und Morphologie der Zellen sowie auf die Riboflavinproduktion	39
1.2. Akkumulation kompatibler Solute und anorganischer Ionen	42
1.3. Glyzerin-Aufnahme oder <i>de novo</i> -Biosynthese?	46
2. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum Riboflavintransport.....	50
2.1. Riboflavintransport an intakten Zellen.....	50
2.1.1. Riboflavinaufnahme	50
2.1.2. Efflux von Riboflavin	53
2.2. Zellbiologische Techniken als Grundlage für die Analyse der vakuolären Riboflavinspeicherung	63
2.2.1. Isolierung der Vakuolen	63
2.2.2. Selektive Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin	66
2.2.3. Aufreinigung der vakuolären H ⁺ -ATPase aus <i>A. gossypii</i>	68
2.3. Vakuoläre Akkumulation von Riboflavin.....	71
2.3.1. Zelluläre Lokalisation von Riboflavin in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer	72
2.3.2. Riboflavintransport an der Vakuolenmembran	73
2.3.3. Nachweis der Abhängigkeit der vakuolären Riboflavinspeicherung von der Aktivität der V-ATPase durch Produktionsversuche	76
2.4. Disruption des <i>VMA1</i> -Gens von <i>A. gossypii</i> und resultierende Stoff-Flußumlenkung von Riboflavin	78
2.4.1. Klonierung und Sequenzierung.....	79
2.4.2. Disruption des <i>VMA1</i> -Gens	81
2.4.3. Physiologie des <i>Agvma</i> ⁻ Phänotyp	82
2.4.4. Stoff-Flußumlenkung von Riboflavin durch die Disruption von <i>AgVMA1</i> ..	86
2.4.5. Riboflavinexport der <i>VMA1</i> -Disruptante Ita-1773.....	90
2.5. 2-D-Gelelektrophorese und Screening nach dem vakuolären Riboflavin-Carrier.....	92

IV. Diskussion	100
1. Biochemische und physiologische Adaptation von <i>A. gossypii</i> an hyperosmotischen Streß	100
2. Transport und Kompartimentierung von Riboflavin	103
2.1. Riboflavintransport an intakten Zellen	103
2.2. Vakuoläre Akkumulation von Riboflavin	106
2.3. Disruption des <i>VMA1</i> -Gens und resultierende Stoff-Flußumlenkung von Riboflavin in <i>A. gossypii</i>	110
3. 2-D-Gelelektrophorese zum Screening auf den vakuolären Riboflavin- transporter von <i>A. gossypii</i>	113
V. Zusammenfassung.....	116
VI. Literatur.....	117

Abkürzungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Drei-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen den IUPAC-Empfehlungen.

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bp	Basenpaare
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPM	<i>decays per minute</i> (radioaktive Zerfälle pro Minute)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
F-ATPase	F ₀ F ₁ -ATPase
FMN	Flavinmononukleotid
Frag.	Fragment (i.d. Beschreibung von Klonierungstechniken)
HA	Ashbya-Vollmedium
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
kb	Kilobasenpaare
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
MA2	Medium <i>Ashbya</i> 2
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MM	Minimalmedium
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert/ reduziert
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kern-Spin-Resonanz)
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TM	Trockenmasse
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg Protein}^{-1}$)
ÜN	über Nacht
URF	<i>unidentified open reading frame</i> (nicht-identifiziertes ORF)
UV	Ultraviolett
V-ATPase	V ₀ V ₁ -ATPase
V _{max}	maximale Umsatzrate
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
v/ v	Volumenprozent
w/ v	Gewichtsprozent
YPD	Hefevollmedium

I. Einleitung

1. Mikrobiologischer Hintergrund

Der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii* (Ashby and Nowell) (Guillermond, 1928) kommt in der Natur in tropischen und subtropischen Lebensräumen als Phytopathogen vor. Er wurde erstmals von Baumwolle isoliert (Ashby und Nowell, 1926), wo er die sogenannte Stigmatomykose hervorruft.

A. gossypii besitzt ein septiertes, sich dichotom verzweigendes Myzel und bildet nach mehreren Tagen Wachstum charakteristische spindelförmige Sporen in interkalar entstehenden Sporangien aus. Diese werden in der Literatur als Asci bezeichnet (Batra, 1973), obwohl bisher nicht gezeigt wurde, daß es sich dabei um Meiosporangien handelt. *A. gossypii* wurde ursprünglich von Guillermond (1928) der zu den Ascomyceten gehörenden Familie der Nematosporaceae zugeordnet. Diese Klassifizierung, ausschließlich aufgrund morphologischer Kriterien vorgenommen, ist jedoch in jüngster Zeit umstritten. Neuere phylogenetische Analysen, basierend auf dem Vergleich von Teilsequenzen der 18 S rDNA, 25 S rDNA sowie der sehr variablen internen Kontrollregionen ITS1 und ITS2 (*Internal Transcribed Spacers*), ordnen *A. gossypii* einerseits mit den ebenfalls phytopathogenen Gattungen *Eremothecium*, *Holleya* und *Nematospora* der neuen Familie der Eremotheciaceae (Kurtzmann, 1995) und andererseits mit den Gattungen *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Nematospora*, *Eremothecium* und *Holleya* der Familie der Saccharomycetaceae zu (Prillinger *et al.*, 1997). Damit wurden erstmals einzellige saprophytische Hefen und dimorphe oder filamentöse parasitische Pilze aufgrund von Sequenzanalysen in einer gemeinsamen Familie zusammengefaßt. Die enge Verwandtschaft zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *A. gossypii* wird auch aus der Sequenzhomologie der entsprechenden Gene für den Translationselongationsfaktor 1a deutlich (Steiner und Philippsen, 1994). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß ARS-Elemente aus *S. cerevisiae* in der Lage sind, die freie Replikation von Plasmiden in *A. gossypii* zu vermitteln (Wright und Philippsen, 1991). Da bisher in keinem anderen filamentösen Pilz eine Funktionalität dieser Elemente erreicht werden konnte (Fincham, 1989), ist dies ein weiterer Beleg für die enge Verwandtschaft von *A. gossypii* und *S. cerevisiae*.

2. Biotechnologische Riboflavinproduktion mit *A. gossypii*

Biotechnologische Bedeutung erhielt *A. gossypii* erstmals durch seine von Wickerham *et al.* (1946) beschriebene Fähigkeit zur Überproduktion von Riboflavin (Vitamin B₂) (**Abb. 1**).



Abb. 1: Riboflavinhaltiges Myzel von *A. gossypii* ItaGS01 im Phasenkontrastmikroskop. Der Eichstrich entspricht 20 µm.

Riboflavin gehört zu den Vitaminen der B-Gruppe, zu der außerdem die ebenfalls wasserlöslichen Vitamine Thiamin (Vitamin B₁), Nicotinamid (B₃), Pantothensäure (B₅), Pyridoxin (B₆), Biotin (H, B₈), *myo*-Inosit, *p*-Aminobenzoesäure, Folsäure und Cobalamin (B₁₂) zählen (Wagner-Jauregg, 1974). Biochemisch wird Riboflavin (IUPAC: 7,8-Dimethyl-10-ribityl-isoalloxazin) von der Vorstufe GTP aus in sechs enzymatischen Reaktionen gebildet. Nach Ringöffnung des Imidazolrings und Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin aus 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHB-P) wird im letzten Schritt aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ein Molekül Riboflavin gebildet (Bacher, 1991). Als Baustein von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) bildet Riboflavin die prosthetische Gruppe der sogenannten Flavoenzyme, zu denen Oxidasen, Reduktasen sowie Dehydrogenasen zählen. Das Isoalloxazinringsystem des Riboflavins fungiert bei diesen Redoxreaktionen als Wasserstoffüberträger (Walpole und Wrigglesworth, 1987). Riboflavin ist für Mensch und Tier essentiell. Es ist hauptsächlich in Fleisch, Eiern und Milchprodukten enthalten. Bei Vitamin-B₂-Mangel treten beim Menschen charakteristische Krankheitsbilder wie Wachstumsstillstand, Haut- und Augenerkrankungen auf. Diese

Symptome, begleitet von einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit, treten auch bei Nutztieren im Falle von Vitamin-B₂-Mangel auf. Die kommerzielle Nutzung von Riboflavin ist dementsprechend vielfältig. Riboflavin wird für therapeutische Zwecke verwendet. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff eingesetzt. Vier Fünftel der Weltjahresproduktion jedoch wird als Futtermittelzusatz für die Tierhaltung produziert (Stahmann, 1994).

Obwohl auch eine chemische Synthese von Riboflavin möglich ist, gewinnt aus Kostengründen die biotechnologische Produktion von Riboflavin zunehmend an Bedeutung (Vandamme, 1992). Mehr als 2500 Tonnen Riboflavin werden inzwischen pro Jahr biotechnologisch produziert. Die mikrobielle Herstellung von Riboflavin hat den Vorteil, daß die Substanz auf diesem Wege in einem einstufigen Prozeß synthetisiert werden kann. Außerdem können als Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden (Lago und Kaplan, 1981). Die chemische Synthese kommt nur noch für solche Anwendungsgebiete in Betracht, für die hochreines Riboflavin nötig ist, wie z.B. in der Humanmedizin. Die bedeutendsten natürlichen Riboflavin-Überproduzenten sind die Hemiascomyceten *Ashbya gossypii* und *Eremothecium ashbyi*. Beide Pilze können vergleichbare Mengen an Vitamin B₂ synthetisieren. *A. gossypii* wird jedoch wegen seiner genetisch höheren Stabilität und damit leichteren Handhabung für den industriellen Prozeß bevorzugt (Demain, 1972). Die Optimierung der Fermentationsbedingungen hinsichtlich geeigneter Kohlenstoffquellen, wie z.B. Pflanzenöle (Lago und Kaplan, 1981; Özbas und Kutsal, 1986), und hinsichtlich der Prozeßführung, wie pH-Wert und Belüftung der Kultur (Kutsal und Özbas, 1989; Özbas und Kutsal, 1992), sowie die Selektion neuer Produktionsstämme nach Sporenmutagenese führten für *A. gossypii* zur Steigerung der Riboflavinausbeute auf mindestens 15 g/l (Bigelis, 1989). Auch Hefen, z. B. *Candida guilliermondii* und *Candida famata* (bei ATCC synonym mit *Candida flarer*) sind zur Riboflavinüberproduktion in der Lage. Bei den *Candida*-Arten setzt im Verlauf der Kultivierung nach Unterschreitung einer bestimmten Eisenkonzentration im Medium (10 µg/l) die Vitamin B₂-Bildung ein (Goodwin, 1959). Dies konnte auf eine Regulation der Gene für die Riboflavinbiosynthese auf Ebene der Transkription zurückgeführt werden, an der das Fe²⁺-Kation in Verbindung mit einem Repressor-Protein beteiligt ist (Logvinenko, 1984 und 1985). Optimierte *C. famata*-Stämme bilden durch eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber Eisen bis zu 20 g/l Vitamin B₂ (Heefner *et al.*, 1992). Im Hinblick auf die Verwendung eisenhaltiger Materialien bei der industriellen Nutzung im großtechnischen Maßstab ist die beschriebene Eisen-Sensitivität jedoch insofern nachteilig, als zur Kultivierung keine Fermenter aus Stahl eingesetzt werden können und damit eine aufwendigere, kostenintensive Prozeßtechnik erforderlich ist. Ein weiterer interessanter biotechnologischer Prozeß wurde mit gentechnisch veränderten Stämmen von *Bacillus subtilis* etabliert. Obwohl *B. subtilis* unter natürlichen Bedingungen kein Riboflavin überproduziert, erleichterte in diesem Bakterium das Vorliegen aller Riboflavinbiosynthese-Gene in einem Operon sowie die besonders gute genetische Zugänglichkeit des Organismus die Konstruktion eines Produktionsstammes (Mironov *et al.*, 1990). Durch

verschiedene Selektionsschritte konnte mit *B. subtilis*-Stämmen inzwischen eine Riboflavinproduktion von etwa 15 g/l erreicht werden (Perkins und Pero, 1993). Diese erfordert aber im Gegensatz zur Produktion mit *A. gossypii* den Einsatz rekombinanter Bakterienstämme (Sauer *et al.*, 1997).

3. Transport von Metaboliten in Hefen und filamentösen Pilzen

Die Kompartimentierung vielfältiger, konkurrierender Stoffwechselbereiche bei gleichzeitiger und kontrollierter Kooperation erlaubt eukaryontischen Organismen eine gegenüber Prokaryonten erhöhte metabolische Flexibilität. Die physiologischen Charakteristika der Pilzzelle werden dementsprechend wesentlich durch die Struktur und Funktion ihrer Membransysteme geprägt, die für die verschiedenen Funktionen bei Nährstoffaufnahme, Energiewandlung oder intrazellulärem Transport mit einer Vielzahl von Transportsystemen ausgestattet sind (Roos, 1993).

Primär aktive Transportsysteme nutzen chemische oder photochemische Energie zur Erzeugung einer elektrochemischen Potentialdifferenz an energiekonservierenden Membranen durch vektorielle Translokation von Protonen oder Natrium-Ionen (Mitchell, 1967). In Pilzen sind die H^+ -ATPasen („Protonenpumpen“) die wichtigsten Vertreter dieser primär aktiven Transportsysteme (Roos, 1993; Jennings, 1995). Das durch ihre Aktivität erzeugte elektrochemische Potential $\Delta\mu_H$ setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: aus dem Protonengradienten ΔpH und dem elektrischen Potential (Membranpotential) $\Delta\psi$ (Nicholls und Ferguson, 1992). Sekundäre Transportsysteme benutzen die durch primäre Pumpen aufgebauten elektrochemischen Gradienten, um Substrate zu transportieren. In sekundären Transportprozessen katalysiert ein Transportprotein, der Carrier, den vektoriellen Transportprozess (Mitchell, 1967 und 1979). Die Bewegung eines akkumulierten („treibenden“) Substrats in Richtung seines Konzentrationsgefälles wird hierbei über den Carrier mit dem Bergauftransport eines zweiten Substrats gekoppelt, d.h., es werden elektrochemische Konzentrationsdifferenzen ineinander umgewandelt. Hierbei werden mechanistisch Uniport, Symport und Antiport unterschieden (Harold, 1986). In die Kategorie der sekundären Transportprozesse ist die Mehrzahl der Nährstoff- und Ionen-Transportprozesse der Pilze einzuordnen (Roos, 1993).

Für Transport-Prozesse in Pilzzellen werden überwiegend Protonenpotentiale genutzt. Natrium-Potentiale sind nach bisherigem Kenntnisstand nur in den Transport von Phosphat involviert (Roos, 1993). Die protonen-transportierenden Systeme der Pilzzelle lassen sich in Analogie zur Pflanzenzelle in mindestens drei Klassen einteilen: die F_0F_1 -ATPase der inneren Mitochondrienmembran (F-Typ), die V_0V_1 -ATPase des Tonoplasten (V-Typ) (s. I.3.) und die Plasmamembran-ATPase (P-Typ). Abb. 2 konkretisiert die Kopplung von Protonen- und Metabolit-Flüssen an der Plasmamembran und an der Vakuolenmembran von Pilzen und Hefen anhand gut untersuchter Beispiele. Die Plasmamembran von Pilzen enthält

zahlreiche Carriersysteme zur Versorgung der Zelle mit Nährstoffen, Cosubstraten und metabolisch wichtigen Intermediaten. Die Zelle katalysiert damit die meist energieabhängige Aufnahme von Zuckern, Zuckeralkoholen, organischen Säuren, Aminosäuren, Peptiden, Nukleinsäurebausteinen, Vitaminen und Ionen (Roos, 1993). Dabei lassen sich folgende Prinzipien erkennen: mit Ausnahme einiger passiv transportierter Hexosen in *S. cerevisiae* erfolgt die Energiekopplung von Aufnahmeprozessen über die Plasmamembran als H^+ -Symport, jedoch mit unterschiedlicher H^+ / Substrat-Stöchiometrie (**Abb. 2**) (Roos, 1993). In der Regel existieren in Pilzen für ein zu transportierendes Molekül zwei oder mehrere Transportsysteme mit überlappender Spezifität, d.h. neben hochspezifischen, nur auf ein bestimmtes Transportsubstrat ausgerichteten Systemen gibt es solche, die Gruppen strukturell verwandter Moleküle akzeptieren (Kotyk und Janacek, 1975; Jennings, 1976; Cooper, 1982). Dies wird besonders deutlich am Beispiel des Aminosäuretransports. In Pilzzellen wurde wie in allen bisher untersuchten eukaryontischen Mikroorganismen eine „Allgemeine Aminosäure-Permease“ (*general amino acid permease*, GAP) nachgewiesen, welche die aktive Aufnahme aller L- α -Aminosäuren katalysiert. Daneben existiert eine große Zahl von Aminosäurecarriern mit höherer Spezifität, deren individuelle Eigenschaften und Verteilungsmuster für eine bestimmte Spezies charakteristisch sind (Jennings, 1976). Diese Diversität trägt mehreren Aspekten Rechnung: der Verfügbarkeit einer bestimmten Aminosäure, ihrer Bedeutung für die Zelle und den energetischen Grundlagen von Metabolismus und Transport für diese Aminosäure. Die Kontrolle der Bildung, des Abbaus und der Aktivität der Carrier ist ein wesentlicher Teil der adaptiven Antwort der Pilzzelle auf wechselnde Umweltbedingungen, z.B. auf Nährstofflimitation. Häufig ist die Repression der Synthese von Transportsystemen vom Abbau bzw. von der Inaktivierung der noch vorhandenen Carrierproteine begleitet. Dies ist, zusammen mit der Neusynthese von Carriern, die Grundlage für rasche Änderungen der Transportkapazität der Pilzzelle (Roos, 1993).

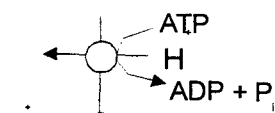
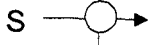
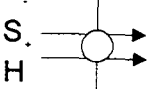
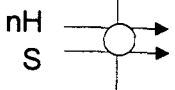
I. EINLEITUNG

Abb. 2: Kopplung von Protonen- und Metabolit-Flüssen an der **(A)** Plasmamembran und **(B)** am Tonoplasten in Pilzen [nach: Roos, 1993]

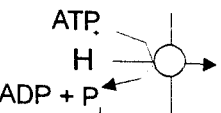
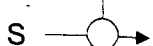
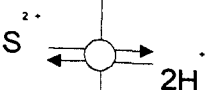
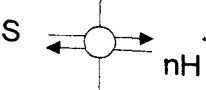
ΔS Konzentrationsgradient des Transportanten
 ΔpH Protonengradient ($pH_{\text{innen}} - pH_{\text{außen}}$)
 $\Delta \Psi$ Potentialdifferenz zwischen beiden Membranoberflächen, pmf *proton motive force*

Untersuchte Organismen: S.c. - *Saccharomyces cerevisiae*, N.c. - *Neurospora crassa*, P.Ch. - *Penicillium chrysogenum*

A

Prinzip	Triebkraft	Beispiel
<hr/> Plasmamembran <hr/>		
	ATP	H^+ -ATPase
	$\Delta S; \Delta \Psi$	K^+, NH_4^+ [N.c., S.c., P.c.]
	$\Delta S; \Delta pH$	Lactat, Propionat, Formiat, Acetat, Pyruvat [S.c.]
	$\Delta S; pmf$	Maltose [S.c.] Glucose [N.c.] Galactose [S.c.]

B

	<hr/> Tonoplast <hr/>	
	ATP	H^+ -ATPase
	$\Delta \Psi; \Delta S$	Cl [S.c., N.c.]
	$\Delta S; \Delta pH$	Ca^{2+} [S.c.]
	$\Delta S; pmf$	Aminosäuren [S.c., N.c. u.a.]

Von den vakuolären Transportprozessen ist bislang der Aminosäuretransport am besten untersucht (**Abb. 2**). Die wichtigste Funktion des vakuolären Aminosäurepools besteht in der Regulation der cytosolischen Aminosäurekonzentration. In *S. cerevisiae* wurden bisher 11 vakuoläre Transportsysteme für individuelle bzw. Gruppen von Aminosäuren sowie eine GAP (*general amino acid permease*) nachgewiesen. Alle benutzen das durch die vakuoläre H^+ -ATPase erzeugten elektrochemische Protonenpotential als Energiequelle für die aktive Aufnahme in die Vakuole (Roos, 1993; Jennings, 1995). Man nimmt außerdem an, daß die Bindung an Polyphosphat zur Erzeugung der bis zu 1000fachen Konzentrationsgradienten vakuolär kompartimentierter Aminosäuren wie auch zur Akkumulation positiv geladener Ionen beiträgt, da die elektrochemische Potentialdifferenz über den Tonoplasten allein wahrscheinlich nicht ausreicht (Weiss, 1973).

Riboflavintransport in Pilzen konnte für Riboflavin-auxotrophe Mutanten der Hefen *Pichia guilliermondii* und *S. cerevisiae* beschrieben werden (Sibirnyi, 1977; Perl, 1976). Wildtyp-Zellen beider Hefen zeigten hingegen keine meßbare Aufnahmeaktivität. Die für die auxotrophe *P. guilliermondii* beschriebene Riboflavin-Permease akkumuliert Riboflavin aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in die Zelle. Es liegt ein energieabhängiger Aufnahmeprozess vor, der durch die Zugabe von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung hemmbar ist (Sibirnyi, 1977). Die kinetische Analyse der Riboflavin-Aufnahme zeigt Sättigungsverhalten, die Affinität des Transports (K_M -Wert) ließ sich in den beiden zur Verfügung stehenden Stämmen zu 0,17 und 2,0 mM bestimmen (Sibirnyi, 1977). Die Permease zeigt in ihrer Aktivität starke pH- und Temperaturabhängigkeit. Die Substratspezifität des Carriers ist eng, der Transport der Cofaktoren FMN und FAD wird nicht katalysiert. Der Riboflavintransport kann durch Saccharose gehemmt werden, was auf die Existenz ein und desselben Transportsystem für die Aufnahme von Riboflavin und Saccharose in *Pichia* schließen ließ (Sibirnyi, 1977). Auch für einen Riboflavin-auxotrophen Stamm von *S. cerevisiae* wurde ein carrier-vermittelter Aufnahmeprozess mit starker Temperatur- und pH-Abhängigkeit nachgewiesen (Perl, 1976). Der Transport zeigte ebenfalls Michaelis-Menten-Kinetik, der K_M -Wert der Riboflavin-Aufnahme wurde zu 15 μ M bestimmt. Die Aufnahme wird durch monovalente anorganische Ionen verstärkt, wohingegen die Substratanaloga Lumiflavin, Tetraacetylriboflavin und N-10-[4'-Carboxybutyl]-7,8-dimethylisoalloxazin als kompetitive Inhibitoren wirken. Im Falle von *S. cerevisiae* konnte keine Konkurrenz von Zuckern um den Transporter nachgewiesen werden.

Ein für einen putativen mitochondrialen Flavin-Nukleotid-Carrier codierendes Gen konnte in Atmungsketten-Defektmutanten von *S. cerevisiae* durch homologe Komplementation isoliert werden (Tzagoloff *et al.*, 1996). Die abgeleitete Proteinsequenz von *FLX1* (*flavin exchange*) weist das kodierte Protein als Mitglied der mitochondrialen Transportproteine aus, zu der z.B. auch der mitochondriale Phosphat-Carrier gehören (Krämer und Palmieri, 1989; Kuan und Saier, 1993). Für Hepatocyten der Ratte wurde zunächst die Existenz eines FMN-Transporters in der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen, welcher die Aufnahme von FMN für die Umsetzung zu FAD katalysiert (Barile *et al.*, 1993). Erst kürzlich konnte

auch die Existenz eines Riboflavin-Aufnahmesystems in Mitochondrien aus Ratten-Hepatocyten nachgewiesen werden, welches ebenfalls als Ausgangsstoff für die FAD-Synthese eingesetzt wird (Pallotta *et al.*, 1998).

Vakuolärer Riboflavintransport zur vakuolären Speicherung von Riboflavin in Pilzen und Hefen konnte bisher nicht beschrieben werden.

4. Die vakuoläre H^+ -ATPase

Das sogenannte zentralvakuoläre System eukaryontischer Zellen besteht aus endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, sekretorischen Vesikeln, Lysosomen sowie den Vakuolen von Pilz- und Pflanzenzellen (Forgac, 1989). Energiespeicherung über die Zellmembran dieser verschiedenen Organellen erfolgt hierbei durch die Aktivität elektrogener Pumpen, hauptsächlich durch die V-Typ-ATPase (Finbow und Harrison, 1997).

Die V-ATPase pumpt Protonen vom Cytoplasma ins Lumen der Vakuole, wobei die nötige Energie durch Hydrolyse von ATP zur Verfügung gestellt wird. In dieser Funktion ist die V-ATPase nicht nur für die Homöostase des cytosolischen pH wichtig (Umemoto *et al.*, 1991; Bauerle *et al.*, 1993; Manolson *et al.*, 1992a). Das Protonenpumpen der V-ATPase ist auch ein elektrogener Prozeß. Die entstehende elektrochemische Potentialdifferenz über den Tonoplasten wird von der Zelle als Triebkraft für den Transport von Ionen und organischen Substanzen über die Organellmembran genutzt (Finbow und Harrison, 1997). Solch ein Mechanismus liegt beispielsweise der Akkumulation von Aminosäuren ins Lumen der Vakuole zugrunde (Kane *et al.*, 1992). Das saure Milieu wird auch für andere Funktionen genutzt, u.a. aktiviert es hydrolytische Enzyme in den Lysosomen (Hirata *et al.*, 1990). Ein niedriger pH ist Voraussetzung für die korrekte Aufnahme vakuolärer Proteine aus den provakuolären Vesikeln des Golgi-Apparates, in dem es ihre Ablösung von den Vesikelrezeptoren ermöglicht (Nelson *et al.*, 1989). Ein niedriger pH ist außerdem zur proteolytischen Reifung der vakuolären Enzyme (Spaltung der Zymogene) erforderlich (Nelson *et al.*, 1989). Gerichtete Sezernierungsprozesse innerhalb des endosomalen/lysosomalen Kompartiments sind ebenfalls von der Aktivität der V-ATPase abhängig.

Die Klasse der V-ATPasen ist strukturell verwandt mit der Klasse der F_0F_1 -ATP-Synthase (F-ATPase) von Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten (Gogarten *et al.*, 1989). Sie scheinen evolutiv eine gemeinsame Ursprungsform zu haben (Gogarten *et al.*, 1989; Nelson und Taiz, 1989). Inzwischen konnten wahrscheinlich alle Untereinheiten der beiden ATPasen identifiziert und die zugehörigen Gene aus einer Reihe von Organismen sequenziert werden. Die Klassen der V- und F-ATPasen unterscheiden sich von anderen Membranpumpen wie der P-Typ-ATPase und der Familie der ABC-Transporter (*bacterial ATP-binding cassette transporters*) durch den Aufbau aus zwei Multiuntereinheiten-Komplexen. Die Membransektoren V_0/F_0 formen jeweils den Protonenkanal, wohingegen die katalytische Einheit von den hydrophilen, periphär assoziierten Proteinen V_1/F_1 gebildet wird.

Hierbei ragt V_1 der V-ATPase ins Cytoplasma der Zelle, F_1 in die mitochondrielle Matrix. Die F- und V-ATPasen nutzen einen Mechanismus zur ATP-Hydrolyse, bei dem das charakteristische Phosphoenzym-Intermediat des P-Typs nicht auftritt (Finbow und Harrison, 1997).

In der Hefe *S. cerevisiae* ist die V-ATPase aus mindestens 10 Untereinheiten zusammengesetzt, die in ihrer Masse im Bereich von 17 bis 100 kDa liegen (Kane und Stevens, 1992) (**Abb. 3**). Der Protonenkanal wird nach bisherigen Erkenntnissen aus einem multimeren Komplex des 17 kDa-Proteolipids Vma3p gebildet (kodiert durch das Gen *VMA3*) (Nelson und Nelson, 1989). Zusammen mit der 36 kDa- (Bauerle *et al.* 1993) und der 100 kDa-Untereinheit (Manolson *et al.* 1992a und b) bildet Vma3p den V_0 -Sektor. Aus der Hefe wurde zusätzlich das *VMA11*-Gen isoliert, welches für ein zu 54 % mit Vma3p identisches Protein kodiert, dessen Genprodukt jedoch bisher nicht isoliert werden konnte und dessen Funktion daher ungeklärt ist. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit können Vma3p und Vma11p einander nicht komplementieren, Disruption von *VMA3* oder *VMA11* führt zu Verlust der V-ATPase-Aktivität (Umemoto *et al.*, 1991). Die periphere V_1 -Untereinheit besteht in einer 6-zähligen Symmetrie aus je 3 Kopien des 69 kDa- (Hirata *et al.*, 1990) und des 60 kDa-Proteins (Nelson *et al.*, 1989), die die katalytische und regulatorische Einheit des V_1 -Subkomplexes bilden. An dieses Hexamer sind die 54-, 42-, 32-, und 27 kDa-Untereinheiten assoziiert (Bauerle *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1993 a und 1993b). Weiterhin konnten eine Reihe Proteine identifiziert werden, die zwar nicht mit dem endgültigen Proteinkomplex assoziiert sind, aber nachweislich eine essentielle Rolle für die Zusammenlagerung der V-ATPase spielen (Hill und Stevens, 1994; Hirata *et al.*, 1993).

Hefe-Deletionsmutanten, denen irgendeine der beschriebenen V-ATPase-Untereinheiten fehlt (mit Ausnahme der 100 kDa-Untereinheit, Manolson *et al.*, 1994), zeigen einen charakteristischen Phänotyp, den sogenannten *vma*-Phänotyp (Finbow und Harrison, 1997). Die Deletion von V-ATPase-Untereinheiten führt zu einer dysfunktionalen Vakuole und hat dadurch unter normalen pH-Bedingungen letale Auswirkungen auf die Zellen (Ho *et al.*, 1993a und 1993b; Preston *et al.*, 1989; Nelson und Nelson, 1990; Graham *et al.*, 1994 und 1995; Kane *et al.*, 1992). Wachstum von *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten ist nur in sauren Medien möglich, vermutlich, weil eine Ansäuerung der Vakuole durch Äquilibration mit dem Medium erfolgt. Als Erklärung hierfür dient ein Endozytosemechanismus. *vma*-Mutanten weisen außerdem eine erhöhte Calcium-Empfindlichkeit auf, Wachstum auf nicht-vergärbaren C-Quellen wurde nicht beobachtet (Finbow und Harrison, 1997). Isolierte Membranen von *Saccharomyces vma*-Mutanten zeigen keine ATPase Aktivität.

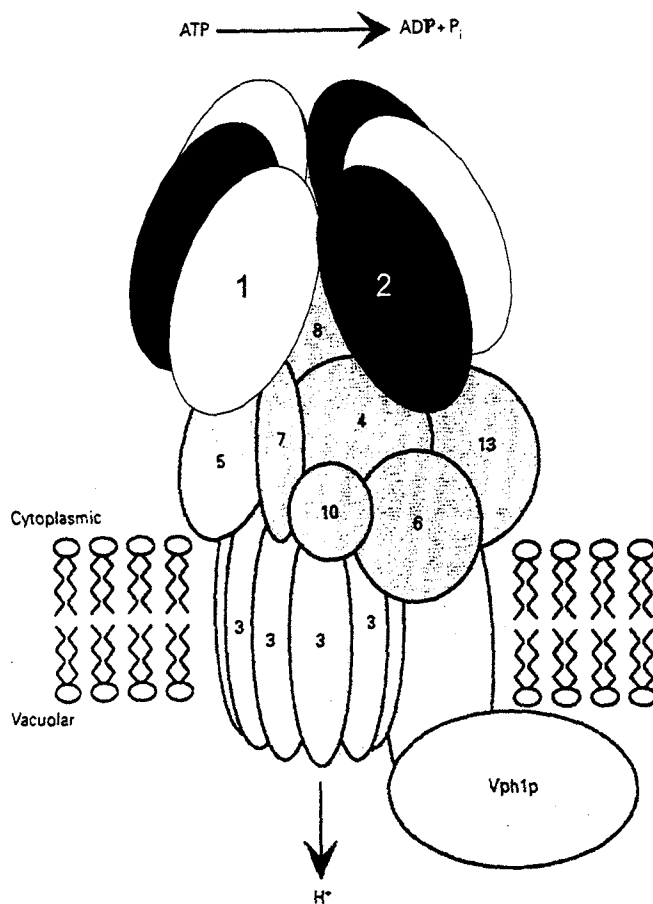


Abb. 3: Struktur der V-ATPase von *S. cerevisiae* [aus: Finbow und Harrison (1997)]

Die funktionelle Domäne V_1 enthält je drei Kopien der Polypeptide Vma1p (1) und Vma2p (2) und je eine Kopie von Vma4p (4) und Vma8p (8). Weiterhin sind die Proteine Vma7p (7), Vma5p (5) und Vma13p (13) mit V_1 assoziiert und für Funktion oder Zusammenlagerung des Enzyms unentbehrlich. Vma5p und Vma8p stehen in Kontakt mit Vma3p (3), welches zumindest teilweise den Protonenkanal bildet. Vma6p (6) ist ein lösliches, aber fest an V_0 gebundenes Protein und scheint auch in

die Protonentranslokation involviert. Vma10p (10) wird für die Assoziation von V_1 mit V_0 benötigt. Die große lösliche Domäne Vph1p wird als extra-zytoplasmatisch angenommen und ist in Verbindung mit dem Proteolipid Vma3p essentiell für das Pumpen von Protonen.

Im filamentösen Pilz *Neurospora crassa* wurde versucht, das *VMA1* und *VMA2* Gen durch RIPing („repeat-induced point mutations“) zu inaktivieren (Bowman *et al.*, 1992; Ferea und Bowman, 1996). Stämme ohne funktionelle Kopie der Gene *VMA1* und *VMA2* konnten im Gegensatz zu *S. cerevisiae* nicht isoliert werden. Phänotypen von filamentösen Pilzen ohne funktionelle V-ATPase konnten daher bislang nicht beschrieben werden.

5. Vakuoläre Akkumulation von Metaboliten in Pilzen und Hefen

Die vakuoläre Kompartimentierung von Metaboliten in Pilzzellen ist am besten im Falle der Aminosäuren untersucht. Zur Regulation cytosolischer Konzentrationen werden in der Vakuole erhebliche Anteile von Aminosäuren akkumuliert, insbesondere fast der gesamte Bestand an basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin (Messenguy *et al.*, 1980) (Tab. 1). Das Verhältnis zwischen dem vakuolären und dem cytosolischen Gehalt ist für individuelle Aminosäuren sehr unterschiedlich und wird in Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung der Zelle, der Wachstumsgeschwindigkeit, der Entwicklungsphase und anderer Faktoren reguliert (Messenguy *et al.*, 1980). Die Aufrechterhaltung der vakuolären Pools und ihre Wechselbeziehung mit den cytosolischen Aminosäuren erfolgt über zahlreiche Carriersysteme in der Vakuolenmembran (Roos, 1993 und 1995).

Tab. 1: Mittelwerte für die Verteilung der Aminosäurepools zwischen Cytoplasma und Vakuole in *S. cerevisiae* unter Standard-Wachstumsbedingungen.
[nach Messenguy *et al.*, 1980]

Aminosäure	Cytoplasmatischer Pool [%]	Vakuolärer Pool [%]
Aspartat	73	27
Glutamat	62	38
Leucin, Isoleucin	50	50
Threonin, Serin, Glycin, Alanin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin	25	75
Asparagin, Glutamin, Citrullin	15	85
Ornithin, Lysin, Histidin, Arginin	10	90

Die Transportmechanismen, welche die Wechselwirkungen zwischen vakuolären und cytosolischen Pools ermöglichen, sind vielfältig und lassen trotz des bisher geringen Kenntnisstandes wesentliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gattungen *Saccharomyces* und *Penicillium* erkennen. Von grundsätzlicher Bedeutung ist das Verhältnis zwischen unidirektionaler Aufnahme und Efflux. In *Penicillium aurantogriseum* (Roos, 1993) und *P. chrysogenum* (Roos, 1997) wurde beispielsweise für mehrere Aminosäuren ein dynamisches Gleichgewicht von aktiver Aufnahme in die Vakuole und passivem Efflux ins Cytosol nachgewiesen. Erst wenn die vakuoläre Konzentration einen Schwellenwert erreicht hat, überschreitet der Efflux die Kapazität der Aufnahme. Damit kommt es zum Anstieg der cytosolischen Konzentration und zum Efflux aus der Zelle. In *S. cerevisiae* wird dagegen die

Akkumulation in stärkerem Maße durch trans-Hemmung der Aufnahme kontrolliert und kein wesentlicher Efflux aus der Zelle ist nachweisbar (Roos, 1993).

6. Osmoregulation

Die biotechnologische Produktion von Riboflavin erfolgt mittels „fed-batch“-Fermentationen. Durch Zufüttern von Pflanzenöl und anderen organischen Substanzen während des Fermentationsprozesses kommt es über die Fermentationsdauer zu einem starken Anstieg der Osmolalität in der Kultur. Neben den Untersuchungen zur Biosynthese, dem Transport und der Kompartimentierung von Riboflavin ist daher auch die Analyse der Adaptation von *A. gossypii* an hyperosmotischen Streß von wirtschaftlichem Interesse.

Unter Osmoregulation wird die für zelluläre Funktionen wie Wachstum, Metabolismus und Reproduktion erforderliche Aufrechterhaltung von Zellvolumen und Turgordruck bei wechselnden osmotischen Bedingungen verstanden (Brown *et al.*, 1986). Wechselnde osmotische Bedingungen für die Zelle werden durch die Erhöhung oder Erniedrigung der in Wasser gelösten Teilchenkonzentrationen verursacht. Bei einem Gradienten zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Medium strebt das System einem Konzentrationsausgleich durch Wasserein- oder -ausstrom entgegen. Biologische Membranen sind gut permeabel für Wasser und einige kleine, unpolare Moleküle, stellen aber effektive Diffusionsbarrieren für größere, polare Substanzen dar. Ohne osmoregulatorische Mechanismen würde die resultierende Osmose im Falle von hyperosmotischem Streß zu Wasserentzug und Turgorverlust und im Falle von hypoosmotischem Streß zu unreguliertem Wassereinstrom in die Zelle führen.

Der osmotische Druck, der sich durch den Wassereinstrom zwischen einer Lösung und dem Lösungsmittel getrennt durch eine semipermeable Membran aufbaut, kann durch folgende Gleichung beschrieben werden (nach Brown, 1990):

$$\pi [\text{Pa}] = (-RT \ln a_w) / V_w$$

R = allg. Gaskonstante [$\text{m}^3\text{Pa}/\text{molK}$], T = Temperatur [K], a_w = Wasseraktivität, die sich aus der Multiplikation des Aktivitätskoeffizienten γ mit dem Molenbruch (Raoult'sches Gesetz) ergibt:

$$a_w = \gamma_w n_w / (n_w + n_i), V_w = \text{molares Volumen von Wasser } [\text{m}^3/\text{mol}]$$

Unter physiologischen Bedingungen ist die zellinterne Osmolalität (mol gelöste Teilchen/ kg Lösung) höher als die externe Osmolalität, wodurch sich aufgrund der Osmose ein Turgordruck aufbaut. Die Aufrechterhaltung des Turgordrucks ist für Wachstum und Sporulation der Zellen essentiell.

Mikroorganismen haben verschiedene Strategien entwickelt, sich an hyperosmotische Bedingungen zu adaptieren: einige Halophile adaptieren an hohe externe

Salzkonzentrationen durch cytoplasmatische Akkumulation von Salz, um die niedrige Wasseraktivität des umgebenden Mediums auszugleichen (Galinski und Herzog, 1990). Diese Art von Adaptation wird von halophilen Archaea (Lanyi, 1974) und anaerob halophilen Eubakterien angewandt (Rengpipat *et al.*, 1988). Andere halo- und osmophile Bakterien genauso wie eukaryontische Zellen akkumulieren oder synthetisieren sogenannte kompatible Solute (Measures, 1975; Brown, 1976; Trüper und Galinski, 1986; Poolmann, 1998; Peter *et al.*, 1996). Diese Substanzen können in den Zellen in außerordentlich hohen Konzentrationen akkumuliert werden, ohne schädigend auf den Zellmetabolismus zu wirken (Csonka, 1989; Csonka und Hanson, 1991).

Die Mechanismen der Osmoadaptation in Pilzen wurden bisher hauptsächlich an Hefen untersucht. Hierbei haben sich die Untersuchungen fast ausschließlich auf die halotoleranten Hefen *Debaryomyces hansenii*, die xerotolerante Hefe *Saccharomyces rouxii* und die nicht-tolerante Hefe *S. cerevisiae* beschränkt. Es konnte gezeigt werden, daß in Hefen die Langzeitstrategie zur Adaptation an Medien mit niedriger Wasseraktivität in der Akkumulatiion von Polyolen, vornehmlich von Glyzerin, besteht (André *et al.*, 1988; Yagi, 1988; Mager und Varela, 1993). Nur wenige Daten sind im Gegensatz dazu über die osmotische Adaptation in filamentösen Pilzen erhältlich. Einige Untersuchungen zeigten, daß Mannit und Glyzerin die am häufigsten in filamentösen Pilzen akkumulierten Polyole sind. Erythritol und Ribitol, aber auch Trehalose und Prolin wurden ebenfalls in einigen Pilzen nachgewiesen (Luard, 1982; Hocking und Norton, 1982; Wethered und Jennings, 1985; Brown, 1978). Das Spektrum kompatibler Solute der filamentösen Pilze ist damit deutlich breiter als das der einzelligen Hefen.

Zielsetzung

Riboflavin wird durch *A. gossypii* überproduziert und ausgeschieden. Durch Selektion und Mutagenese stehen industrielle Hochleistungsstämme zur Verfügung, die auf Pflanzenölen, insbesondere Sojaöl, als Nährsubstrat hohe Ausbeuten von bis zu 15 g/l liefern (Bigelis, 1989). Ziel der vorliegenden Arbeit war die noch ausstehende Aufklärung von subzellulärer Kompartimentierung und Transport von Riboflavin in *A. gossypii*. Zunächst standen Mechanismus, Energetik und Regulation des Riboflavintransports beim Wildtyp und eines Riboflavin-produzierenden Stammes im Mittelpunkt der Untersuchung. Hierbei sollten die Transportprozesse über Plasmamembran und Tonoplast differenziert untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte weiterhin die biochemische Grundlage der vakuolären Riboflavinspeicherung aufgeklärt werden. Die dabei gewonnenen Daten sollten zur Konstruktion neuer Riboflavinproduzenten mit vollständiger Produktexkretion ins Kulturmedium unter Umgehung der vakuolären Akkumulation genutzt werden. Im Rahmen der Untersuchungen zur Adaptation an hyperosmotische Streßbedingungen sollte eine Charakterisierung und Klassifizierung der vorliegenden Adaptationsmechanismen erfolgen.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien

Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham International, Buckinghamshire, GB:

U-[¹⁴C]-Glucose, U-[¹⁴C]-Desoxyglucose
L- 3-[¹⁴C]-Lysin und L-3-[¹⁴C]-Arginin

Calbiochem, Bad Soden, D:

ZW 3-14 (*n*-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat)

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Hefeextrakt, Sojabohnenmehl

Fluka Chemie AG, Buchs, Ch:

Digitonin, α-D-Mannopyranosid, Triton X-100®

Millipore, Eschborn, D:

Glasfaserfilter, Typ F, Porengröße 0,45 µm

Molecular Probes, GB:

Acridin Orange

Moravek Biochemicals, Kalifornien, USA:

[¹⁴C(U)]-Glyzerin

Pharmacia Biotech, Freiburg, D:

Sephacose® CL-6B, Zubehör zur 2-D-Gelelektrophorese

Reformhaus:

Sojaöl

Sigma, Deisenhofen, D:

Ficoll, myo-Inosit, Geneticin (G418), FMN, FAD

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen, D), Merck (Darmstadt, D) oder Boehringer (Mannheim, D) in p.A. Qualität bezogen.

2. Verwendete Stämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *A. gossypii* sowie ihre Eigenschaften sind in **Tabelle 2** zusammengestellt. **Tabelle 3** zeigt die verwendeten Plasmide.

Tab. 2: Verwendete Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevanter Geno-/ Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> JM101	F' <i>trd36lacI9Δ(lacZ)M15proA⁺B⁺/supEthiΔ</i> (<i>lac-proAB</i>) kompetente Zellen zur Transformation	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
<i>S. cerevisiae</i> DSM 70452	Wildtyp	DSMZ
<i>A. gossypii</i> ATCC 10895	Wildtyp	ATCC
Lu441	Riboflavinauxotrophie	J. Revuelta, Salamanca
Ita-GS-01	Ita ^R , erhöhte Riboflavinproduktion	Schmidt <i>et al.</i> (1996)
A27	<i>rib8</i> , <i>RIB5::GAPp-RIB5</i> erhöhte Riboflavinproduktion	J. Revuelta, Salamanca
A4-1773	<i>vma1::g418</i> (ATCC 10895 Δ <i>vma1</i> 0,25 kb-Frag. <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> II/ Frag. <i>Spe</i> I- <i>Nco</i> I von pJR 1773) dysfunktionale V-ATPase	diese Arbeit
Ita-1773	<i>vma1::g418</i> (Ita-GS-01 Δ <i>vma1</i> 0,25 kb-Frag. <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> II/ Frag. <i>Spe</i> I- <i>Nco</i> I von pJR 1773) dysfunktionale V-ATPase, erhöhte Riboflavinproduktion	diese Arbeit
A27-1773	<i>vma1::g418</i> (A27 Δ <i>vma1</i> 0,25 kb-Frag. <i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> II/ Frag. <i>Spe</i> I- <i>Nco</i> I von pJR 1773) dysfunktionale V-ATPase, erhöhte Riboflavinproduktion	diese Arbeit

Ita ^R	= Resistenz gegenüber Itaconat, einem spezifischen Inhibitor der Isocitratlyase
G418 ^R	= Resistenz gegenüber G418 (Geneticin), vermittelt durch eine Aminoglykosid-Phosphotransferase
DSMZ	= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>

II. MATERIAL UND METHODEN

Tab. 3: Liste der verwendeten Plasmide und deren Eigenschaften

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pUC19	Amp ^R , lacZ'	Vieira und Messing (1982)
pGEM [®] t	blunt end vector, pGEM [®] t-rZf(+) <i>EcoRV</i> , 3'-thymidiliert, f1 ori, T7 Promotor, Sp6 RNA Polymerase Promotor, α -Region der β -Galaktosidase	Promega
BSK ⁺	Expressionsvektor	Stratagene
pJR1685	pGEM [®] t + 685 bp PCR-Fragment aus AgVMA1	diese Arbeit
pJR1033	pGEM [®] t + PCR-GAP-B	J. Revuelta, Salamanca
pJR1764	pJR1033 Δ pstI	diese Arbeit
pJR1767	pJR1764 <i>NcoI-SpeI</i> + VMA1-PCR-Fragment <i>NcoI-SpeI</i> von pJR1685	diese Arbeit
pJR1566	pUC19 <i>BamHI-PstI</i> + G418 ^R <i>BamHI-PstI</i> , Expressionsvektor	J. Revuelta, Salamanca modifiziert nach Steiner (1991)
pJR1773	pJR1767 <i>BamHI-PstI</i> + Fragment <i>BamHI-PstI</i> G418 ^R von pJR1566	diese Arbeit
pJR1775	Cosmid mit positivem Klon nach Screenen der Cosmid-Genbank mit pJR1685 <i>Apal-SacI</i> [³² P]-dCTP	diese Arbeit
pJR1796	BSK ⁺ + positives 1 kb-Fragment von VMA1 nach Restriktion von pJR1775 mit <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pJR1797	BSK ⁺ + positives 7 kb-Fragment von VMA1 nach Restriktion von pJR1775 mit <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pJR1805	3 kb-Fragment von pJR1797 <i>EcoRI-BamHI</i>	diese Arbeit
pJR1808	BSK ⁺ <i>SacII-PstI</i> + 0,7 kb-Fragment von pJR1805 <i>SacII-PstI</i>	diese Arbeit
pJR1809	BSK ⁺ <i>SacII-PstI</i> + 1,2 kb-Fragment von pJR1805 <i>SacII-PstI</i>	diese Arbeit
pJR1814	BSK ⁺ <i>HincII-BamHI</i> + 0,4 kb-Fragment von pJR1796 <i>HincII-BamHI</i>	diese Arbeit
pJR1815	BSK ⁺ <i>HincII-BamHI</i> + 0,7 kb-Fragment von pJR1796 <i>HincII-BamHI</i>	diese Arbeit
pJR1818	BSK ⁺ <i>HindIII</i> + 0,9 kb-Fragment von pJR1809 <i>HindIII</i>	diese Arbeit

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Zur Erstellung von Agarplatten wurden die verwendeten Medien jeweils mit 40 g/l Agar versetzt. Zur Selektion wurden den Medien 50 µg/ml Ampicillin (*E. coli*) oder 50 µg/ml Kanamycin (*A. gossypii*) zugesetzt. Eine Stammlösung der Antibiotika wurde nach Abkühlung der Medien auf ca. 60 °C sterilfiltriert zugegeben.

LB (Luria Broth)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10,0	g/l
Hefeextrakt	5,0	g/l
NaCl	10,0	g/l

YPD-Medium (Sherman *et al.*, 1986)

Hefeextrakt	10,0	g/l	pH 6,8
Pepton	20,0	g/l	
Glucose	20,0	g/l	

HA-Vollmedium (Stahmann *et al.* 1994)

Hefeextrakt	10,0	g/l	pH 6,8
Glucose	10,0	g/l	

Produktionsmedium (Stahmann *et al.* 1994)

Hefeextrakt	10,0	g/l
Sojaöl	10,0	g/l
Glyzin	6,0	g/l

MA2-Vollmedium (J. Revuelta, Salamanca)

Pepton	20,0	g/l	pH 6,8
Hefeextrakt	2,0	g/l	
<i>myo</i> -Inosit	0,6	g/l	
Glucose	20,0	g/l	

Minimalmedium SMM (Altmann-Jöhl und Philippsen, 1996)

Glucose	10,0	g/l	pH 6,8
<i>myo</i> -Inosit	0,3	g/l	
L-Asparagin	0,5	g/l	
KH ₂ PO ₄	0,5	g/l	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5	g/l	
NaCl	0,5	g/l	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25	g/l	

II. MATERIAL UND METHODEN

SMASH (Sporulation medium Ashbya) (J. Revuelta, Salamanca)

Sojabohnenmehl	3	g/l	
Hefeextrakt	3	g/l	
Malzextrakt	3	g/l	
Maisquellwasser	20	g/l	
Glucose	10	g/l	pH 6,8

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte ausschließlich in LB-Komplexmedium (Sambrook *et al.*, 1989). Die Kultivierung erfolgte in Reagenzgläsern mit 3 ml Medium bei 200 rpm und 37 °C.

S. cerevisiae DSM 70452 wurde auf Vollmedium (YPD) gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte in 500 ml Schikanekolben mit je 100 ml Medium bei 120 rpm und 30 °C. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Die Lagerung der Stämme erfolgte auf Stammhaltungsplatten, die bei 4 °C gelagert und monatlich überimpft wurden.

A. gossypii-Stämme wurden auf Stammhaltungsplatten bei 4 °C gelagert und diese alle 14 Tage erneuert, oder das Myzel wurde bei -70 °C in 30 % Glyzerin eingefroren bzw. Sporen (s. 6.1.) in 0,03 % (w/v) Triton X-100 bei 4 °C aufbewahrt. Vorkulturen wurden über Nacht in 100 ml Kolben mit HA-Vollmedium oder Produktionsmedium angezogen. Ausgehend von den Stammhaltungsplatten wurde zum Beimpfen dieser Vorkulturen das Myzel mit Hilfe von Glasperlen (\varnothing 5 mm) zerkleinert, um möglichst homogene Kulturen zu erhalten. Zur Kultivierung von *A. gossypii* wurden 500 ml Schikanekolben mit HA-Vollmedium, MA2-Vollmedium oder Minimalmedium (Anzucht der VMA1-Disruptanten in Anwesenheit von 250 µg/ml Geneticin) bei 30 °C, 120 rpm verwendet. Für Produktionsversuche wurde *A. gossypii* auf Produktionsmedium (öhlaltig) in schikanefreien Rundkolben angezogen.

Ein Vergleich der Riboflavinproduktion verschiedener Stämme bzw. in verschiedenen Kulturmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, jeweils über einen Zeitraum von 3 Tagen durchgeführt. Es wurden dabei jeweils gleich alte Stammhaltungsplatten zum Beimpfen der Vorkulturen verwendet. Desweiteren wurden ausschließlich die mit einer Mediencharge und gleichem Inokulum durchgeführten Experimente miteinander verglichen.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden nach Ernten der Zellen sämtliche Versuche und Waschvorgänge mit folgendem Standardpuffer durchgeführt:

NaP_i-Puffer: 50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, 5 mM KCl pH 6,5

4. Biochemische und zellbiologische Methoden

4.1. Silikonölzentrifugation

Die Silikonölzentrifugation ermöglicht die schnelle und vollständige Trennung der Zellen vom Kulturmedium und ihre gleichzeitige Inaktivierung (Klingenberg und Pfaff, 1977). Auf diese Weise ist sichergestellt, daß keine Verfälschungen der internen Konzentrationen durch Synthese, Abbau, Exkretion oder Diffusion von Metaboliten erfolgt. Die Silikonölzentrifugation wurde zur Bestimmung von zellulären Metabolitkonzentrationen in Transportversuchen mit Protoplasten sowie zur Bestimmung des Zellinnenvolumens von Hyphen und Protoplasten verwendet. Die Zellsuspension wurde zur Silikonölzentrifugation in spezielle Beckmann-Reaktionsgefäße (300 µl) überführt, die zuvor mit 30 µl 20 %iger Perchlorsäure, überschichtet mit 65 µl Silikonöl, bestückt wurden. Die Dichte des verwendeten Silikonöls betrug $d = 1,05 \text{ g/cm}^3$ für Protoplasten (nach Protoplastieren in 0,5 M Sorbit) und $1,015 \text{ g/cm}^3$ für *Ashbya*-Myzel. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (30 s in einer Microfuge (Beckmann) bei maximaler Geschwindigkeit) wurden die Zellen durch das Silikonöl getrieben, während das Medium im Überstand verblieb. Die extrazellulären Konzentrationen der Metabolite und Sonden konnten direkt in den zellfreien Überständen gemessen werden.

Für die Bestimmung der internen Konzentrationen der radioaktiv markierten Substanzen wurden die Zellextrakte aufgearbeitet. Hierfür wurden die Reaktionsgefäße in der Ölschicht durchtrennt und das Perchlorsäure-Lysat in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt, in 750 µl H₂O resuspendiert und abzentrifugiert. Die Extrakte wurden danach 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 14.000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge) wurde die Konzentration der radioaktiven Substanzen in 650 µl des Überstandes durch Szintillationszählung (LS 6500, Beckmann) bestimmt.

4.2. Bestimmung des Zellinnenvolumens von *A. gossypii*

Das interne Gesamtvolumen der Zellen, bestehend aus cytoplasmatischem und vakuolärem Raum, wurde nach der Methode von Rottenberg (1979) über zwei radioaktive Marker unterschiedlicher Membrangängigkeit bestimmt: [¹⁴C]Taurin als Marker für den extrazellulären Raum und ³H₂O für das gesamte permeable Volumen, wobei die Technik der Silikonölzentrifugation (s. 4.1.) zur Abtrennung der Zellen angewendet wurde. Es wurde sowohl das Volumen von Protoplasten als auch das von Hyphenzellen bestimmt. Für Protoplasten von *A. gossypii* wurde ein intrazelluläres Volumen von 3,4 µl/mg Protein, für Hyphenzellen eines von 1,63 µl/mg TM gefunden. Diese Werte wurden für alle Berechnungen verwendet. Das Zellvolumen hyperosmotisch gestresster Zellen (s. III.1.3.) unterschied sich nicht von Zellen unter Standardbedingungen (Auswertung über

II. MATERIAL UND METHODEN

Elektronenmikroskopie, 8.2.), jedoch verminderte sich der Anteil der Vakuolen am Zellinnenvolumen (s. Abb. 5).

4.3. Herstellung von Rohextrakten von *A. gossypii*

Rohextrakte wurden erstellt, indem 0,1 - 0,2 g Feuchtmasse in 1 ml 50 mM NaP_i -Puffer, pH 6,5, resuspendiert wurden. Die Zellsuspension wurde 10 min in einer Kugelmühle (Retsch-Schwingmühle TYP MM2) unter Zugabe von 1 g Glasperlen (0,5 mm \varnothing) bei 4 °C homogenisiert. Das entstandene Lysat wurde anschließend 10 min bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert, um Zelltrümmer und Membranfetzen zu pelletieren. Der klare Überstand wurde zur Bestimmung von Proteingehalt und Enzymaktivitäten eingesetzt. Vakuolen-Extrakte wurden aus isolierten Vakuolen (s. 4.8.) hergestellt. Hierfür wurden die durch Zentrifugation gewonnenen und in 0,9 M Sorbit befindlichen Vakuolen in gleicher Weise behandelt. Die Proteinkonzentration der Gesamt-Zellextrakte betrug ca. 6,5 mg/ml, die der Vakuolenextrakte ungefähr 0,1 mg/ml.

4.4. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten von Hexokinase, Fumarase und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase

Alle photometrischen Enzymtests, die mit einem Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia) kontinuierlich gemessen werden konnten, sind in **Tabelle 4** zusammengefaßt.

Tab. 4: Kontinuierliche photometrische Enzymassays. Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen im Test-Ansatz (1 ml).

Enzym	Testansatz	Substrat	Wellenlänge Temperatur Extinktions- koeffizient	Referenz
Hexokinase EC 2.7.1.1.	50 mM Tris/ HCl pH 7,5 MgCl ₂ [30 mM] NADP [2,5 mM] ATP [5 mM], pH 7,5 G-6P-DH (0,35 U)	Glukose[50 mM]	340 nm 30 °C 6,3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Easterby & Quadri (1982)
Fumarase EC. 4.2.1.2.	100mM Tris/ HCl pH 7,5	L-Malat [50 mM]	240 nm 30 °C 40 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Wells & Lees (1991)
Glycerin-3- Phosphat- Dehydrogenase EC1.1.1.8.	20 mM Imidazol/HCl, pH 7,0 DTT [1 mM] MgCl ₂ [1 mM] NADH [0,1 mM]	DHAP [0,7 mM]	340 nm 30 °C 6,3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Blomberg & Adler (1989)

4.5. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der α -Mannosidase

Die Aktivität der α -Mannosidase (EC 3.2.1.24) in Vakuolenextrakten und Vakuolenmembranen wurde nach einer von Ram *et al.* (1978) etablierten Methode durchgeführt. Das Prinzip des Assays basiert auf Messung der Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid zu α -D-Mannopyranosid und dem chromogenen Aglykon *p*-Nitrophenol.

Reagenzien:	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid	[10 mM]
	Na-Acetatpuffer	[1 M] pH 5,5
Glyzin-Puffer:	Glyzin	[133 mM]
	NaCl	[67 mM]
	Na ₂ CO ₃	[83 mM]

pH 10,7 eingestellt mit 1 N NaOH

Der Standard-Testansatz zur Bestimmung der α -Mannosidase-Aktivität besteht aus 0,1 ml *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid, 0,05 ml Na-Acetat-Puffer, pH 5,5 und Enzym, aufgefüllt mit Wasser *ad* 0,5 ml. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wird die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml Glyzin-Puffer, pH 10,7, abgestoppt. Die Extinktion des klaren Überstandes (Zentrifugation, falls notwendig) wird bei 400 nm gemessen, um die Menge an freigesetztem *p*-Nitrophenol zu bestimmen. Enzym- und Substrat-Nullkontrollen wurden stets mitgemessen. Eine Enzym-Einheit „Unit“ entspricht dabei der Freisetzung von 1 μ mol *p*-Nitrophenol pro Minute. Die spezifische Aktivität wird als Units Enzymaktivität pro mg Protein (U/mg) ausgedrückt.

4.6. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der V-ATPase

Die Aktivität der vakuolären H⁺-ATPase (V-ATPase) wurde kolorimetrisch über die Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i) aus ATP bestimmt. Der Aktivitätsassay wurde an reinen Vakuolenmembranen, präpariert wie unter Punkt 5.1. beschrieben, durchgeführt. Das Standard-Reaktionsgemisch (1000 μ l) bestand hierbei aus 20 bis 25 μ g Membranprotein, 5 mM MgCl₂, 5 mM KN₃ und 20 μ M Na₃VO₄ (um restliche anhaftende mitochondrielle und Plasmamembran-ATPase-Aktivität zu hemmen) in 25 mM HEPES Puffer, pH 7,5. Die Reaktion wurde nach Vortexen der Komponenten durch Zugabe von 5 mM Na-ATP gestartet. Nach 30minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Hydrolyse von ATP mit 100 μ l 3 M HClO₄ gestoppt und das freigesetzte anorganische Phosphat photometrisch (λ = 600 nm) über Anfärbung mit Malachitgrün und Ammoniumhexamolybdat bestimmt (Lanzetta *et al.* 1979). Als Kontrollen wurden stets ein Ansatz mit *Aqua dest.* statt Membranprotein und ein Ansatz, der zur Zeit *t* = 0 gestoppt wurde, mitgemessen.

4.7. Herstellung von Protoplasten aus Hyphen von *A. gossypii*

Zellen einer 300 ml-Kultur wurden in der späten stationären Phase (nach ca. 30 h Wachstum) durch Filtration geerntet, und zweimal mit etwa 100 ml Na₂P₆-Puffer (s.II.3.) gewaschen. Protoplasten konnten dann aus den Hyphen über Inkubation mit *Lysing Enzymes* (Sigma), einem Cocktail aus Zellulasen, Proteasen und Chitinasen, durch vollständigen enzymatischen Abbau der Zellwand präpariert werden. Hierfür wurden die gewaschenen Hyphen in einer die freigesetzten Protoplasten osmotisch stabilisierenden Protoplastier-Lösung (pro Gramm Feuchtmasse 15 ml 0,9 M Sorbit in 50 mM NaPi-Puffer, pH 6,5) mit 35 mg *Lysing Enzymes* zum Abbau der Zellwand 15 min bei 120 rpm, 30 °C, inkubiert. Die erhaltenen Protoplasten wurden durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 5000 g aus der Protoplastierlösung abgetrennt und noch zweimal mit je 50 ml Protoplastierlösung gewaschen.

4.8. Isolierung der Vakuolen aus Hyphen von *A. gossypii*

Beim Protoplastieren der Hyphen (s. 4.7.) bildet sich eine heterogene Population von Protoplasten, die sich statistisch in unterschiedlich großen Hyphenabschnitten bilden und eine variable Anzahl an Vakuolen enthalten. Zur Isolierung der Vakuolen wurden die Protoplasten zunächst mechanisch aufgeschlossen. Das Protoplastenpellet wurde dazu in 1 vol Protoplastierlösung resuspendiert und 4 min mit einem Teflon-Stab (Heidolph RZR 2020, höchste Stufe) gepottert. Die Protoplasten wurden dabei auf Eis gekühlt. Die Vakuolen wurden aus dem entstandenen Protoplasten-Lysat nach einem Waschschrift in Protoplastierlösung durch Zentrifugation in einem Stufengradienten aufgereinigt. Es wurden 15 vol Ficoll (10 % w/v) in 0,9 M Saccharose in einem 15 ml-Falcon Reaktionsgefäß vorgelegt und 1 vol des Protoplasten-Lysats durch vorsichtiges Vortexen eingemischt. Diese Mischung wurde mit 10 vol 0,9 M Saccharose und 2,5 vol 0,9 M Sorbit überschichtet. Hierbei ist das Überschichten der eingemischten Probe mit den beiden leichteren Gradientenbestandteilen besonders kritisch für die erfolgreiche Abtrennung der Vakuolen aus dem Protoplastenlysat. Die Vakuolen wurden durch Zentrifugation (80 min, 800 x g, Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Ausschwingrotor) von unlysierten Protoplasten und Zelltrümmern abgetrennt.

4.9. Selektive Permeabilisierung der Plasmamembran von *A. gossypii*

Ziel war die getrennte Analyse von Metaboliten in cytosolischem und vakuolärem Kompartiment. Hierfür wurde das Myzel durch Filtration geerntet (Glasfaser-Rundfilter, Ø 4,5 cm) und mit Na₂P₆-Puffer gewaschen. Die Pilzzellen (0,5 g Feuchtmasse) wurden in 10 ml Permeabilisierungslösung (0,001 - 0,02 % (w/v) Digitonin in Na₂P₆-Puffer) resuspendiert und in dieser Permeabilisierungslösung 10 min bei 30 °C, 120 rpm im Laborschüttler (Braun) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen durch Filtration aus der Lösung

abgetrennt und durch gründliches Waschen mit NaP_i -Puffer von anhaftender Permeabilisierungslösung befreit. Die Permeabilisierungsfiltrate wurden auf ihren Riboflavin- (4.12.) und Aminosäuregehalt (4.13.) analysiert. Die permeabilisierten Hyphen wurden außerdem zur Charakterisierung von Transportvorgängen über den Tonoplasten in Transportversuche eingesetzt (4.10. u. 4.11.).

4.10. Riboflavin-Effluxmessungen

Ashbya gossypii-Zellen der Stämme ItaGS01 und A27 wurden in der mittleren Produktionsphase (50 - 70 h-Kultur) geerntet (Filtration) und gewaschen und bei einer Zelldichte von etwa 7 - 8 mg TM/ ml in vorgewärmten (30 °C) NaP_i -Puffer resuspendiert, um den Riboflavinefflux zu initiieren. Der Efflux wurde zu definierten Zeitpunkten durch schnelle Filtration über Glasfaserfilter (Millipore) beendet; hierbei wurden während der ersten 5 h des Effluxes etwa alle 30 min 750 μl -Aliquots mit einer sterilen Pipette mit abgeschnittener Plastikspitze (leichtere Probennahme bei Pelletmyzel) entnommen. Die sezernierte Riboflavinmenge wurde im Filtrat wie unter 4.12. beschrieben bestimmt.

4.11. Bestimmung von Aufnahmeraten

Zur Bestimmung von Aufnahmeraten wurden folgende radioaktiv markierte Substanzen verwendet: [^{14}C]Arginin, [^{14}C]Lysin, [^{14}C]Glucose, [^{14}C]Desoxyglucose (Amersham); [^{14}C]Glyzerin (Moravek) und [^{14}C]Riboflavin (synthetisiert von der BASF AG, Ludwigshafen).

Für die Aufnahmemessungen wurden die Zellen über Nacht in HA-Medium angezogen. Im Falle der Untersuchungen zur Osmoadaptation wurden die Zellen teilweise auf hochosmolalem Medium, dessen Osmolalität mit 0,2 M NaCl oder 0,4 M Mannit eingestellt wurde, angezogen. Die Zellen wurden in der stationären Phase durch Filtration geerntet und mit NaP_i -Puffer der entsprechenden Osmolalität gewaschen. Die Zellen wurden in NaP_i -Puffer der entsprechenden Osmolalität resuspendiert (Zelldichte ca. 8 mg TM/ml) und vor Zugabe der radioaktiv markierten Substrate 5 min bei 30 °C vortemperiert. Um die von den Zellen akkumulierte Menge an radioaktiv markiertem Substrat zu unterschiedlichen Zeiten zu bestimmen, wurde die Methode der schnellen Filtration angewendet. Dabei wurden die Zellen vom umgebenden Medium über Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hölzel, Dörfen) abgetrennt. Noch an den Zellen oder Filtern haftendes Medium/ Radioaktivität wurde durch dreimaliges Waschen mit jeweils 3,0 ml Waschlösung (je nach Versuchsbedingungen angegeben) innerhalb von 5 sec nach der Probennahme entfernt. Anschließend wurden die Filter entnommen, 30 min bei 70 °C getrocknet und mit 5 ml Szintillationscocktail (Canberra-Packard, Frankfurt) versetzt. Nach 1 h Inkubation wurde die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckmann) gemessen.

II. MATERIAL UND METHODEN

Im Falle der [^{14}C]Glyzerin-Aufnahmemessung wurde nicht die Radioaktivität in den Zellen, sondern die Restradioaktivität im Filtrat bestimmt. Diese subtrahierende Methode verhindert Verfälschungen des Ergebnisses durch den Glyzerinmetabolismus. Hierfür wurde das Filtrat mit einem Filtrationsgerät aufgefangen (1225-Vielfach-Filtrationsgerät, Millipore) und durch Metabolismus entstandenes CO_2 durch Ansäuern mit 1 N HCl ausgetrieben. Anschließend wurde das Filtrat mit 1 N KOH neutralisiert und je 500 μl in 5 ml Szintillationscocktail zur Szintillationszählung eingesetzt.

Für Messungen von Stoffflüssen über den Tonoplasten mit permeabilisierten Zellen wurden die Zellen wie unter Punkt 4.9. beschrieben permeabilisiert und dann sofort zur Aufnahmemessung eingesetzt.

4.12. Quantitative Bestimmung von Biotrockenmasse und Riboflavin

Zur Bestimmung der Pilztrockenmasse wurden 20 - 50 ml Kultur über tarierte Glasfaser-Rundfilter abfiltriert und mit 10fachem Volumen NaP_i -Puffer gewaschen. Das Myzel auf dem Filter wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 60 °C in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend gewogen. Sojaöl-gewachsene Zellen wurden zunächst in 50 ml-Falcon Reaktionsgefäß überführt, 10 min bei 1500 x g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810 R) und die dann oben befindliche Ölschicht mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

Zur quantitativen Bestimmung des in der Kultur enthaltenen Gesamtriboflavins wurde 1 ml der Kultur aufgeschlossen (s. 4.3.). Das resultierende Homogenat wurde 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und der Riboflavingehalt über HPLC (Merck, Darmstadt) unter den nachfolgend beschriebenen Trennbedingungen ermittelt (Schmidt *et al.*, 1996).

Säule:	LiCrospher®100RP-18 (5 μm) (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	50 mM NaH_2PO_4 1 mM Trimethylammoniumchlorid 12 % Acetonitril
Fluß:	1 ml/min
Elution:	isokratisch
Detektion:	270 nm (Merck/ Hitachi L-4200 UV-VIS Detektor)

Riboflavin aus Kompartimentierungsstudien (s. III.2.3.1.) und Effluxmessungen (s. III.2.1.2.2. und 2.3.2.2.) wurde photometrisch durch Extinktionsmessung im jeweiligen Riboflavin-Puffergemisch bei 444 nm bestimmt. Hierzu wurde eine Riboflavin-Eichkurve aufgenommen und die Proben entsprechend mit *Aqua dest.* verdünnt in die Messung eingesetzt.

4.13. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Die quantitative Aminosäurebestimmung in Kulturmedien sowie in den Permeabilisierungsfiltraten (s. 4.9.) erfolgte mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie (HP 1090, Hewlett Packard, Waldbronn). Die Aminosäuren wurden über eine automatische Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Phtaldialdehyd zu stark fluoreszierenden Isoindolen umgesetzt (Sternson *et al.*, 1984). Die unterschiedliche Hydrophobizität der einzelnen Aminosäurederivate ermöglicht hierbei ihre Auftrennung durch eine Basen-deaktivierte Kieselgelsäule (Jones und Gilligan, 1983) unter den nachfolgend beschriebenen Trennbedingungen:

Säule:	Hypersil OD 5 μ (CS Chromatographie Service, Langerwehe)
Laufmittel:	Puffer A: 0,1 M Na-Acetat pH 7,2 Puffer B: Methanol
Fluß:	0,5 ml/ min
Elution:	Gradient von 80 % bis 25 % Puffer A
Detektion:	fluorometrisch Anregungswellenlänge: 243 nm Emissionswellenlänge: 436 nm

4.14. Bestimmung der Osmolalität

Die Osmolalität [Osm/ kg] von Medien und Zellextrakten wurde kryoskopisch (Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung durch die gelösten Teilchen) in einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotech) ermittelt.

4.15. Analyse anorganischer Ionen

Na^+ und K^+ wurden über Atomabsorptionsspektroskopie (Perkin Elmer 3030) bestimmt. Die Analyse von PO_4^{3-} , SO_4^{2-} und Cl^- erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (Dionex 4000i).

4.16. Bestimmung von Adeninnukleotiden

Grundlage des Nachweises der Adeninnukleotide ATP und ADP ist die Lichtemission bei Umsatz von ATP durch das Luciferin/ Luciferase-System (Schimz *et al.*, 1981).



Der verwendete Luciferin/ Luciferase-Rohextrakt liefert keine zeitlich konstante Lichtemission wie hochgereinigte Extrakte, so daß über die ersten 20 Sekunden nach Start der Reaktion gemittelt wurde (Lumat LB 9507, Berthold, Bad Wildbad). Je nach Zelldichte wurden dazu 40 - 80 μl Zellsuspension in 320 bis 360 μl DMSO aufgeschlossen und mit eiskaltem H_2O auf

II. MATERIAL UND METHODEN

Lantern Extract, FLE-50, Sigma) wurden in 10 ml Testpuffer gelöst. Für die Messung wurden jeweils 100 µl Probe vorgelegt. Die Messung wurde durch Zugabe von 100 µl des gelösten Luciferin/ Luciferase-Lyophilisates gestartet. Die ATP-Konzentrationen der Proben wurden über eine Eichgerade im Bereich von 1 nM bis 1 µM ATP unter Berücksichtigung der internen Standards bestimmt.

Testpuffer:	50,0 mM	TRIS-H ₂ SO ₄ , pH 7,4
	3,5 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	2,5 mM	K ₂ SO ₄
	0,6 mM	EDTA

Umsetzung von ADP zu ATP:

500 µl DMSO-Aufschluß wurden mit 45 µl Reaktionspuffer (s. u.) und 5 µl Pyruvatkinase (5000 U/ ml) versetzt und 20 min bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte die sofortige Messung des ATP-Gehaltes.

Reaktionspuffer:	0,5 M	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	2,0 M	KCl
	10,0 mM	TRIS, pH alkalisch, unverändert
	50,0 mM	Phosphoenolpyruvat

5. Proteinchemische Methoden

5.1. Präparation von Vakuolenmembranen

Zur Präparation von Vakuolenmembranen aus den isolierten Organellen wurde eine von Bowman und Bowman (1982) für *Neurospora crassa* etablierte Methode umgearbeitet. Zunächst wurden Vakuolen aus den Hyphen von *A. gossypii* isoliert (s. 4.8.) und durch hypoosmotischen Schock bei 4°C (Verdünnen der Vakuolensuspension mit 30 vol 1 mM EGTA, pH 7,5, eingestellt mit TRIS) während 10 min leichten Schüttelns (80 rpm) bei 4 °C zum Platzen gebracht. Die Vakuolenmembranen wurden durch Ultrazentrifugation (1 h, 100.000 x g) pellettiert und noch zweimal mit der kalten EDTA-Lösung durch Resuspendieren und Ultrazentrifugieren gewaschen. Das Membranpellet wurde abschließend in einem kleinen Aliquot *Aqua dest.* (je nach Ausbeute zwischen 50 und 200 µl) resuspendiert, zum Schutz vor proteolytischem Abbau mit 0,5 mM PMSF versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert. Enzymatische Bestimmungen wurden stets an Aliquots durchgeführt, die nur einem Frier-Tau-Zyklus unterworfen worden waren, um Aktivitätsverluste zu vermeiden.

Der Proteingehalt der Membranpräparationen wurde mit einer Methode nach Smith *et al.* (1985) bestimmt, bei der die Proteine mit Cu²⁺ in basischem Milieu einen vierzähligen Cu⁺-Komplex bilden (Brenner und Harris, 1995). Dieser Komplex reagiert bei 60 °C mit Bicinchonsäure (BCA) zu einem purpurfarbenen Komplex, dessen Konzentration bei 562 nm

photometrisch bestimmt werden kann. Diese Methode wurde mit dem *Micro BCA Protein Assay* von Pierce (Rockford IL, USA) durchgeführt (Atkins und Tuan, 1992).

5.2. Aufreinigung der vakuolären H⁺-ATPase

Für die Aufreinigung wurden Vakuolen präpariert (s. 4.8.) und die vakuoläre ATPase unter Modifikation der Methode von Uchida *et al.* (1985) aufgereinigt. 1 l-Kulturen von *A. gossypii* WT wurden über Nacht auf HA-Vollmedium angezogen und im stationären Zustand durch Filtration geerntet. Die Zellen wurden zur Vakuolenpräparation eingesetzt und die aufgereinigten Vakuolen in Membranvesikel konvertiert, indem die Organellen in doppelt konzentrierten Vesikelpuffer verdünnt wurden. Die vakuolären Membranvesikel konnten bei -80 °C gelagert werden, was es möglich machte, Membranvesikel auf Vorrat zu präparieren und dann vereinigt in die Aufreinigung einzusetzen. Für einen Aufreinigungsvorgang wurden vakuoläre Membranvesikel aus 3 l Kultur gesammelt.

Die vakuolären Vesikel wurden durch Ultrazentrifugation pellettiert (50.000 g, 20 min, Beckmann Optima L-90 K) und zweimal in 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA durch Resuspendieren und Ultrazentrifugieren (s.o.) gewaschen, wobei die resuspendierten Vesikel im ersten Waschgang 3 min gepottet wurden (Heidolph RZR 2020, höchste Stufe). Die gewaschenen Membranen wurden in Solubilisierungspuffer resuspendiert und durch tropfenweise Zugabe des zwitterionischen Detergenz ZW 3-14 (*n*-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, Calbiochem, D) solubilisiert. Die Endkonzentration an ZW 3-14 in den solubilierten Membranen betrug etwa 14 mM. Die solubilierten Proteine wurden zur Abtrennung nicht-solubilisierter Reste 10 min bei 20.000 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (Beckmann, Microfuge R) und die gelösten Proteine für die Auftrennung über den Glyzeringradienten abgenommen.

Die Fraktionierung der solubilierten vakuolären Membranproteine erfolgte über einen Glyzerin-Gradienten. Die solubilierten Proteine (300 µl mit einer Konzentration von etwa 10 mg Protein/ ml) wurden auf einen linearen Glyzerin-Gradienten (20 - 50 %, 12 ml) aufgetragen und bei 125.000 g zentrifugiert (14 h, Sw41 Ti Ausschwingrotor, Beckmann Optima L-90 K Ultrazentrifuge). Nach Abschluß der Zentrifugation wurde der Boden des Zentrifugenröhrchens punktiert und 500 µl-Fractionen durch Auspumpen mit 50 %igem Glyzerin aufgefangen (GradiFrac System mit angeschlossenem UV-Detektor, Pharmacia). Die Fractionen wurden auf ihren Proteingehalt (s. 5.1.) und auf vakuoläre H⁺-ATPase-Aktivität (s. 4.6.) untersucht. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden gleiche Volumina aller Fractionen über Nacht gegen 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5 dialysiert. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die dialysierten Gradientenfractionen in 4fach konzentriertem Laemmli-Puffer aufgenommen (Laemmli, 1970). SDS-Polyacrylamidgele wurden nach einer Vorschrift von Schägger und von Jagow (1987) mit einem Vertikal-Gelsystem (Renner) erstellt. Die Gele bestanden aus einem Trenngel (12 % Acrylamid) und einem Sammelgel (4 % Acrylamid). Die Elektrophorese wurde üblicherweise mit 12,5 mA pro

Probenpuffer:	8,0	M	Harnstoff (Pharmacia)
	1,0	%	Dithiothreitol (DTT)
	0,5	%	Triton X-100
	0,5	%	Pharmalyte 3-10 (Pharmacia)
einige Körnchen Bromphenolblau			
Äquilibrierungspuffer:	6,0	M	Harnstoff
	30,0	%	Glyzerin
	3,0	%	SDS in 0,05 M Tris/ HCl-Puffer, pH 6,8

[alle %-Angaben in Gewichtsprozent (w/v)]

5.4. Färbung der Gele und Auswertung

Die 2-D-Gele wurden entweder mit Silber oder *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Die Silberfärbung wurde modifiziert nach Blum *et al.* (1987) durchgeführt. Die Fixierung der fertigen Gele erfolgte in einer Lösung aus 10 % Essigsäure und 40 % Ethanol in *Aqua dest.* für 30 Minuten. Dann wurden die Gele 30 Minuten in 30 % Ethanol, 7 % (w/v) Natriumacetat, 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat-H₂O und 0,5 % Glutardialdehyd in *Aqua dest.* sensitiviert. Nach dreimaligem Waschen der Gele in *Aqua dest.* für je 5 Minuten wurde die Färbung in einer 0,25 % AgNO₃/ 0,04 %igen Formaldehydlösung für 20 Minuten angeschlossen. Nach zweimal einminütigem Waschen in *Aqua dest.* wurde das komplexierte Ag⁺ durch 2,5 % (w/v) Na₂CO₃ reduziert und die Färbung mit 1,5 % (w/v) EDTA abgestoppt. Coomassie-Färbungen wurden durchgeführt wie bei Görg *et al.* (1988) beschrieben. Silber- und Coomassie-gefärbte Gele wurden zur computergestützten Auswertung eingescannt (Sharp JX-330) und anschließend mit dem Image Master 2-D-Elite® Vs. 2.0 (Pharmacia) ausgewertet.

6. Molekularbiologische Methoden

6.1. Sporenisolierung aus *A. gossypii*

Zur Isolierung von Sporen wurde *A. gossypii*-Myzel 4 - 6 Tage auf Sporulations-Platten (SMASH-Medium) angezogen. Die anschließende Präparation der Sporen erfolgte modifiziert nach Steiner (1991). Dazu wurde das Myzel einer Platte mit Hilfe eines sterilen Spatels abgenommen, in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt und in 10 ml NaP_i-Puffer, pH 6,5, plus 35 mg *Lysing Enzymes* (Sigma) resuspendiert. Die Suspension wurde zur Freisetzung der Sporen aus den Asci 30 min bei 30 °C, 120 rpm inkubiert und anschließend 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das resultierende Sporen-Pellet wurde dreimal mit 0,03 % (w/v) Triton X-100 gewaschen, dabei auf dem Vortex-Mixer durchmischt, und ohne weitere Reinigung zur Inokulation oder Transformation (s. 6.4.2.) verwendet.

6.2. Präparation und Reinigung von DNA

6.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Plasmide wurden aus einer 2 - 5 ml Übernacht-Kultur (Minipräparation), oder aus einer 50 ml Übernacht-Kultur (Midipräparation) präpariert.

Für die Plasmid-Minipräparation wurden 3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin) durch Zentrifugation geerntet (1 min, 14.000 rpm, Eppendorf Minifuge). Das Pellet wurde in 100 µl eiskalte Lösung A durch Vortexen zum Andauen der Zellwand resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Lyse der Zellen mit 200 µl der alkalischen SDS-Lösung (Lösung B), versetzt, vorsichtig durch Schwenken gemischt, um eine Scherung der chromosomalen DNA zu vermeiden, und 5 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 150 µl Lösung C, erneutes gründliches Durchmischen sowie 5 min Inkubation auf Eis. In diesem Schritt wird die chromosomale DNA sowie der größte Teil der Proteine ausgefällt. Nach Zentrifugieren (2 min, 14.000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Phenol/ Chloroform-Extraktion gereinigt (kurzes Vortexen, 2 min Zentrifugation bei 14.000 rpm). Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte nach Zugabe von 2 vol absolutem Ethanol (2 min, RT). Durch Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA pellettiert (5 min, 14.000 rpm) und das Präzipitat zur Entfernung von Salzresten mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac Concentrator, Bachofer) getrocknet und in 50 µl TE-Puffer + 20 µg/ml RNase A resuspendiert. Die RNase-Behandlung erfolgte für 15 min bei 37 °C. Die Konzentrationsbestimmung der Präparation erfolgte durch Gelelektrophorese und Vergleich mit bekannten DNA-Mengen. Die DNA-Konzentrationen der Plasmidpräparationen lag in der Regel zwischen 100 - 200 ng/µl.

Lösung A:	50,0	mM	Glucose	
	10,0	mM	EDTA	
	25,0	mM	Tris/ HCl	pH 8,0
	4,0	mg/ml	Lysozym	
Lösung B:	0,2	N	NaOH	
	1,0	% (w/v)	SDS	
Lösung C:	5,0	M	Kaliumacetat	
	1,8	M	Essigsäure	
TE-Puffer:	10,0	mM	Tris/ HCl	pH 7,6
	1,0	mM	EDTA	

Um besonders reine Plasmid-DNA für die DNA-Sequenzierung zu gewinnen, wurde die Minipräparation mit dem Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) aufgereinigt.

Für die Plasmid-Midipräparation (50 ml-Übernachtskultur) wurde dasselbe Protokoll mit zehnfachen Volumina der Lösungen angewendet. Abweichend wurde die DNA am Ende der Präparation noch einmal über eine 1 ml-Säule, gepackt mit Sepharose® CL-6B (Pharmacia), in einem Zentrifugationsschritt entsalzt.

6.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *A. gossypii*

Das Myzel einer 100 ml-Übernachtskultur wurde durch Filtration geerntet, zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen und zur Protoplastierung und Inaktivierung von DNasen 30 - 60 min bei 28 °C in 10 ml Lösung 1 suspendiert und inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten abzentrifugiert (10 min, 5000 g), zur Lyse in Lösung 2 überführt und 30 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden 20 mg Proteinase K zugegeben und die Lösung 1 h bei 50 °C inkubiert. Nach zwei Phenol/ Chloroform-Extraktionen (1:1 v/v) wurde die DNA mit Isopropanol präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert. Abschließend erfolgte eine RNase-Behandlung (s. 6.2.1.). Nach einer weiteren Präzipitation in Isopropanol wurde die genomische DNA in TE-Puffer (s. 6.2.1.) resuspendiert.

Lösung 1:	1,0	M	Sorbit	
	20,0	mM	EDTA	
	1,0	mg/ml	Zymolyase-20T	
Lösung 2:	50,0	mM	Tris/ HCl	pH 7,5
	150,0	mM	NaCl	
	100,0	mM	EDTA	
	0,5	% (w/v)	SDS	

Zum Nachweis von Gendelektionen über Southern-Blot (s. 6.5.) wurde ein Schnellverfahren zur Minipräparation genomischer DNA angewendet. Mit einer Pinzette wurde ein Stückchen Myzel von einer frischen Platte in 200 µl Puffer A in einem Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden im Puffer suspendiert und mit Hilfe von sterilen Glasperlen (0,4 - 0,5 mm Durchmesser) durch intensives Vortexen (1 min) aufgeschlossen. Es wurden ein gleiches Volumen (ca. 300 µl) TE-Puffer (s. 6.2.2.) plus weitere 100 µl Puffer A zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Zelltrümmer für 2 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge pellettiert. Aus dem Überstand (ca. 300 µl) wurde die genomische DNA mit 600 µl Phenol/ Chloroform (1:1 v/v) extrahiert (Vortexen und nachfolgende Zentrifugation). 250 µl der oberen Phase wurden in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und mit 250 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1 v/v) extrahiert. Die obere wässrige Phase wurde zur Präzipitation der DNA mit 2,5 vol eiskaltem absolutem Ethanol und 1/10 vol 3 M NaOAc pH 7,0 versetzt und die DNA während 2 h bei - 20 °C gefällt. Die pellettierte DNA wurde nach dem Ausfällen 15 min bei 4 °C abzentrifugiert, mit 80 %igem Ethanol gewaschen, das Pellett im Vakuum (SpeedVac Concentrator, Bachofer) getrocknet und abschließend in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

II. MATERIAL UND METHODEN

Puffer A:	10	mM	Tris/ HCl	pH 8,0
	100	mM	NaCl	
	1	mM	EDTA	
	0,1	% (w/v)	SDS	

6.3. Analyse, Rekombination und Modifikation von DNA

Restriktion der DNA. Zur Charakterisierung und Klonierung wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Inkubationspuffer und Reaktionstemperatur wurden entsprechend den Produktinformationen des Herstellers gewählt, die Inkubationsdauer war 90 min. Ein Standardrestriktionsansatz enthielt 100 - 200 ng DNA, 1/10 vol 10fach Reaktionspuffer und 0,5 µl (ca. 5 U) des jeweiligen Restriktionsenzym. Die Auftrennung von restringierten DNA-Fragmenten erfolgte durch Gelelektrophorese in 0,8 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente (Sambrook *et al.*, 1989).

Isolierung von DNA aus Agarosegelen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell unter einem UV-Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Das isolierte Gelfragment wurde für 20 min bei - 20 °C eingefroren. Die DNA wurde schließlich durch mechanisches „Zerstampfen“ des Gelfragmentes im Eppendorf-Gefäß mit einem feinen Glasstäbchen in Lösung gebracht. Die gelöste DNA konnte dann während 5 min bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) vom Gelrückstand abgetrennt und mit einer Pipette abgenommen werden.

Behandlung überhängender DNA-Enden mit Klenow-Polymerase. Die Klenow-Polymerase ist ein carboxyterminales Teilfragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, das sowohl eine 5'-3'-DNA-Polymerase- als auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Durch Restriktionsverdau entstandene überhängende 5'-Enden konnten daher mit Hilfe dieses Enzyms unter Zugabe der entsprechenden freien Desoxynukleotide zu glatten Enden aufgefüllt werden, überhängende 3'-Enden wurden mit demselben Enzym zu glatten Enden abgedaut. Der Standardreaktionsansatz (50 µl) nach Sambrook *et al.* (1989) enthielt 10 µl linearisierte Plasmid-DNA, 1/10 vol 10 x Nick-Translationspuffer, 1/10 vol dNTP-Mix (je 2 mM) und 2 U Klenow-Fragment. Es wurde zunächst die Exonuklease-Reaktion (noch ohne dNTP's) für 30 min bei RT durchgeführt, dann die Polymerase Reaktion durch Zugabe der dNTP's und 1 µl zusätzlichem Klenow-Fragment gestartet. Der Ansatz wurde ebenfalls während 30 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde das Enzym 5 min bei 65 °C inaktiviert und die DNA direkt zur Ligation eingesetzt.

10 x Nick-Translationspuffer:	500,0	mM	Tris/ HCl	pH 7,5
	100,0	mM	MgSO ₄	
	1,0	mM	DTT	
	0,5	mg/ml	BSA	

Ligation von DNA-Fragmenten. Das Einbringen von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4. Die linearisierte Vektor-

DNA wurde zuvor mit alkalischer Phosphatase behandelt, um den Phosphatrest am 5'-Ende zu entfernen und so eine Rezirkularisierung des Plasmids bei der Ligation zu verhindern. Der Ligationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 10 µl: 200 ng linearisierte Plasmid-DNA, 200 ng Fragment-DNA, 1/10 vol 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Der Ligationsansatz wurde 4 h bei RT inkubiert und danach direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

10 x Ligationspuffer:	500	mM	Tris/ HCl	pH 7,6
	100	mM	MgCl ₂	
	100	mM	DTT	
	10	mM	ATP	
	500	µg/ml	BSA	

6.4. Transformationstechniken

6.4.1. Transformation von *E.coli*

Kompetente Zellen wurden nach einer Methode von Yanisch-Perron *et al.* (1985) erstellt. Zur Transformation wurden zunächst jeweils 100 µl kompetente Zellen *E. coli* JM101 (OD 0,3 - 0,4) mit 100 ng Plasmid-DNA 20 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 2 min bei 42 °C im Wasserbad geschockt und nochmals 2 min auf Eis (4°C) abgekühlt. Schließlich wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz zur Regeneration der Zellen 60 min bei 37 °C im Rotationsinkubator (Braun) (120 rpm) inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann in einer Verdünnungsreihe auf Selektionsmedium ausplattiert.

6.4.2. Transformation von *A. gossypii*

Die Transformation von *A. gossypii* erfolgte durch Elektroporation ausgekeimter Sporen in Gegenwart von linearer DNA. Hierbei dient homologe Rekombination als Hauptintegrationsmechanismus ins Chromosom. Ungefähr 10⁹ Sporen (s. 6.1., Zahl bestimmt in Thomakammer) des zu transformierenden *A. gossypii*-Stammes wurden in 250 ml MA2 Flüssigkultur inokuliert und 10 - 12 h bei 28 °C auf einem Laborschüttler angezogen (250 rpm). In dieser kurzen Inkubationszeit wurden frisch ausgekeimte Sporen gewonnen, die durch Filtration (steril) geerntet und in 20 ml 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,5), 25 mM DTT, resuspendiert wurden. Die Sporen wurden in dieser Lösung 30 min bei 28 °C inkubiert, um die Plasmamembran auf die Elektroporation vorzubereiten. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5000 x g), zweimal mit 20 ml eiskaltem Elektroporationspuffer (STM) gewaschen und in einem weiteren Milliliter STM resuspendiert. Suspensionsaliquots (120 µl) wurden mit 1 - 2 ng der zu transferierenden DNA in 4 mm-Elektroporationsküvetten gebracht. Die Elektroporation erfolgte mit einem *Gene Pulser* (Biorad, München), Bedingungen s.u. Nach dem Elektropuls (s.u.) wurde sofort MA2-Medium bis zu einem Endvolumen von 1 ml in die Küvette gegeben und in einer Verdünnungsreihe (1:1 bis 1:40)

II. MATERIAL UND METHODEN

auf MA2-Agarplatten ausplattiert, die zur Regeneration der Zellen zunächst für 6 h bei 28 °C bebrütet wurden. Zur Selektion wurden die Platten anschließend mit 6 ml Topagar (250 µg/ ml Geneticin) überschichtet. Transformanden wurden nach 2 - 3 Tagen Inkubation bei 30 °C sichtbar. Als positive Kontrolle wurde ein bereits als gut transferierbar erwiesenes DNA-Stück elektroporiert, negative Kontrollen (ohne Transfer-DNA bzw. ohne Elektropuls) ergaben keine Transformanden.

Transferbedingungen:	Spannung:	1500 V/ cm
	Widerstand:	200 Ω
	Kapazität:	25 µF
Elektroporationspuffer STM:	10 mM	Tris/ HCl pH 7,5
	270 mM	Saccharose
	1 mM	MgCl ₂
Topagar:	0,4 % (w/v)	Agarose
	250 µg/ ml	Geneticin

Der Topagar wurde 20 min bei 120 °C sterilisiert.

Nach Abkühlen auf 42 °C wurden 150 µl einer sterilfiltrierten Geneticin-Stammlösung (50 mg/ml) zugesetzt.

Da *A. gossypii* ein Myzel aus mehrkernigen Zellen besitzt (Batra, 1973), führt die Transformation einzelner dieser Kerne bei der Elektroporation zu einem Heterokaryon. In diesem tragen nur einige Kerne die eingeführte Mutation und den Resistenzmarker, andere dagegen bleiben unverändert. Aus einem solchen Heterokaryon mußten daher durch Isolierung der einkernigen Sporen and anschließende Selektion auf Geneticin-Resistenz homokaryontische Stämme erzeugt werden (Steiner *et al.*, 1995). Dazu wurden die nach der Elektroporation erhaltenen Geneticin-resistenten Klone in Gegenwart von Geneticin angezogen und einer weiteren Sporenpräparation unterworfen. Die erhaltenen Sporen wurden auf MA2-Vollmedium mit Geneticin vereinzelt. Waren 100 % der überimpften Klone gegen Geneticin resistent, so wurde geschlossen, daß die anfangs isolierte Einzelkolonie homokaryontisch war.

6.5. Southern-Blot-Analyse

Für die Isolierung von Genen aus einer Cosmid-Genbank, für den Nachweis von Deletionen bestimmter Genbereiche und um die Anzahl genomischer Kopien eines Gens zu überprüfen, wurden DNA:DNA-Hybridisierungen nach Southern (1975) durchgeführt. Dazu wurde die restringierte DNA zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Agarosegele zur Vorbereitung auf den DNA-Transfer jeweils 20 min mit Depurinierungslösung, mit Denaturierungslösung und abschließend mit Neutralisierungslösung behandelt. Der DNA-Transfer auf die Membran erfolgte, indem das

Gel für 24 h mit 10 x SSC-Lösung überschichtet wurde. Zur Verbesserung der Transferwirkung wurde die auf das Gel aufgelegte Membran zusätzlich mit mehreren Lagen saugfähigen Filterpapiers überschichtet. Nach dem Trocknen der Nylonmembran wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (4 min, 366 nm, Transilluminator N 90, Konrad Benda, Wiesloch) auf der Membran fixiert. Vor der DNA:DNA-Hybridisierung wurde die Membran in der Prähybridisierungslösung 2 h bei 42 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Diese Lösung wurde dann durch 7 ml Hybridisierungslösung plus der bei 100 °C (5 min) denaturierten [³²P]-dCTP-markierten DNA-Sonde (Feinberg und Vogelstein, 1983) ersetzt und ÜN unter verschiedenen Stringenzbedingungen (45, 55 oder 68 °C + 1 % SDS) hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und zweimaliges Waschen mit Waschlösung 2 bei 68 °C entfernt. Der Nachweis der DNA:DNA-Hybride erfolgte durch Exposition des Blots auf einen Röntgenfilm für 5 h - 10 h bei - 70 °C.

Depurinierungslösung	0,3	M	HCl	
Denaturierungslösung:	0,5	M	NaOH	
	1,5	M	NaCl	
Neutralisierungslösung:	1,0	M	Tris-HCl	pH 7,5
	1,5	M	NaCl	
20 x SSC:	0,3	M	Na-Citrat/HCl	pH 7,0
	3,0	M	NaCl	
Prähybridisierungslösung:	50,0	% (w/v)	Formamid	
	2,0	% (v/v)	50 x Denhardt's Lösung	
	50,0	mM	TRIS/HCl	
	1,0	M	NaCl	
	0,1	% (w/v)	NaP _i P _i	
	1,0	% (w/v)	SDS	
	0,1	% (w/v)	Dextransulfat	
Hybridisierungslösung:	65,0	% (w/v)	Formamid	
	14,0	% (v/v)	100 x Denhardt's	
	60,0	mM	TRIS/HCl	
	0,1	% (w/v)	NaP _i P _i	
	1,0	% (w/v)	SDS	
50X Denhardt's Lösung:	1,0	% (w/v)	Ficoll	
	1,0	% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon	
	1,0	% (w/v)	Rinderserumalbumin	
Waschlösung 1:	2,0	x	SSC	
	0,1	% (w/v)	SDS	
Waschlösung 2:	0,1	x	SSC	
	0,1	% (w/v)	SDS	

II. MATERIAL UND METHODEN

6.6. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Das Amplifizieren von Genfragmenten erfolgte über Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR-Reaktion wurde im Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur und die Zeit der Kettenverlängerung wurden je nach GC-Gehalt, Länge der eingesetzten Primer und Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen zur Isolierung des *AgVMA1*-Gens ist in **Tabelle 5** gegeben. Hierfür wurden die degenerierten Primer CF1a und CF1b eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde das entsprechende Fragment des *VMA1*-Gens aus *S. cerevisiae* mithilfe der homologen Primer CF1a-hom und CF1b-hom amplifiziert. **Tabelle 6** gibt einen Überblick über die verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 5: Amplifikationsbedingungen zur Isolierung von *AgVMA1* und *ScVMA1*

Amplifikationsreaktion	Isolierung von <i>AgVMA1</i>		Amplifikation von <i>Sc VMA1</i>	
10 x Taq-Puffer	5 µl		5 µl	
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	1 µl		1 µl	
Primer 1	8 µM	(CF1a)	4 µM	(CF1a-hom)
Primer 2	4 µM	(CF1b)	4 µM	(CF1b-hom)
zu amplifizierende DNA	5 ng	<i>A. gossypii</i> -DNA	5 ng	<i>S. cerevisiae</i> -DNA
Taq-Polymerase	2,5 U		2,5 U	
Aqua dest.	ad 50 µl		ad 50 µl	

Taq 10 x-Puffer:	100,0 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	15,0 mM	MgCl ₂
	0,5 M	KCl
	1,0 mg/ml	Gelatine

Amplifikationsbedingungen:

Zur Amplifikation wurden jeweils 35 Synthesezyklen durchlaufen, die die folgenden Schritte umfaßten:

1. Denaturierung der Template-DNA: 30 sec 94 °C
2. *Annealing* der *Primer* an die denaturierte Template DNA: 60 sec, 52 °C
3. Polymerisation: 1 min/ 1000 bp Fragmentgröße; 72 °C

Tab. 6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
CF1	ATYCARGTBTAYGARAC	Isolierung von <i>AgVMA1</i>
CF1b	ATVACRGTYTTRCCRCA	Isolierung von <i>AgVMA1</i>
CF1hom	ATCCAAGTTTACGAAGAAACT	Isolierung von <i>ScVMA1</i>
CF1bhom	GATAACGGTCTTACCACA	Isolierung von <i>ScVMA1</i>

Sämtliche für die PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, D) bezogen.

6.7. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung (Kettenabbruchmethode von Sanger, (1977)) der isolierten DNA-Fragmente wurde nicht-radioaktiv mit einer automatischen Sequenzierapparatur durchgeführt (Gene Amp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems). Sie erfolgte durch Einbau fluoreszenzmarkierter dNTP's über eine PCR-ähnliche Reaktion. Zum Sequenzieren wurden 600 ng DNA eingesetzt, Amplifikationsreaktion und -bedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt.

Tab. 7: Für die Sequenzierreaktion verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
universal	GTAAAACGACGGCCAAGT	Sequenzierung von <i>VMA1</i> -Subklonen in BSK ⁺ und pUC19
reverse	GAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung von <i>VMA1</i> -Subklonen in BSK ⁺ und pUC19

Für die Analyse der Sequenzdaten wurde das Programm HUSAR 4.0 (EMBL, Heidelberg) verwendet. Die Programme BLASTX und BLASTP (EMBL, Heidelberg) wurden für Homologiestudien eingesetzt. Die Nukleotidsequenz des in dieser Arbeit isolierten Ag*VMA1*-Gens ist unter der *Accession*-Nummer AJ009881 in der DNA-Datenbank (EMBL, Heidelberg) zu finden.

7. ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektroskopie wurde durchgeführt, um unter hyperosmotischem Stress akkumulierte kompatible Solute zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Zellen wurden auf Medien mit verschiedenen osmotisch wirksamen Zusätzen in Übernacht-Kultur angezogen und durch Filtration (Glasfaser-Rundfilter) geerntet. Die Zellen wurden mit NaP_i-Puffer, pH 6,5 gleicher Osmolalität, eingestellt mit NaCl, gewaschen, bis keine anhaftenden organischen Substanzen, vor allem Mannit, mehr über ¹H-NMR in der Waschflüssigkeit detektiert werden konnten (ca. 5 vol). Die gewaschenen Hyphen wurden dann in destilliertem Wasser aufgenommen und 5 min bei 4 °C inkubiert, um durch den hypoosmotischen Schock Efflux der kompatiblen Solute zu induzieren. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat („Schock-Fluid“) zur ¹H-NMR-Spektroskopie eingesetzt.

Die Proben für ¹H-NMR-Analyse wurden vakuumgetrocknet und in 0,6 ml ²H₂O resuspendiert, welches 2 mM Natrium-3-trimethylsilyl-[2,2',3,3',-²H₄]Propionat als Referenz enthielt. Hochaufgelöste NMR-Spektren dieser Proben konnten mit einem Bruker AMX-400 WB Spektrometer (Bruker Spectrospin, Faellanden, Schweiz), welches bei 400,13 MHz betrieben wurde, aufgenommen werden. Die Messparameter sind im folgenden aufgelistet: 90° Puls, 6 kHz Spektralweite, 32 K Fourier Transformation der Daten, 25 s Wiederholungszeit und 2 s Vorsättigung des Wassersignals (Wendisch *et al.*, 1997).

Resonanzfrequenzen wurden in der Auswertung der Spektren als ppm relativ zum internen Standard Natrium-3-trimethylsilyl-[2,2',3,3',-²H₄]Propionat angegeben.

8. Mikroskopische Techniken

8.1. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Phasenkontrastaufnahmen wurden an einem Zeiss Photomikroskop II bei 400 - 800facher Vergrößerung durchgeführt.

Die Intaktheit der Vakuolenmembran und die Aktivität der V-ATPase wurden über Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridin Orange überprüft. Zur Färbung wurden die aus dem Kulturmedium abfiltrierten und gewaschenen Hyphen 20 min bei 30 °C in NaP_i-Puffer mit 80 mg/ml Acridin Orange (Merck) inkubiert. Die intrazelluläre Lokalisation des Farbstoffes wurde fluoreszenzmikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung an einem LEICA Laborlux S Mikroskop analysiert. Zur Detektion der Acridin Orange Fluoreszenz wurde das Mikroskop mit dem Filtermodul „H“ (Excitation 420 - 450 nm, Emission > 520 nm) ausgerüstet. Das Färbeergebnis wurde mit einer Videokamera aufgezeichnet (Kappa CF 8/1, FMCC) und mit einem *Image Processing*-System (Kontron, KS 400 V 2.0) ausgewertet (III.2.2.2.) oder durch Fotografie dokumentiert (III.2.4.3.).

8.2. Elektronenmikroskopie und Morphometrie

Die elektronenmikroskopische Darstellung erfolgte nach Gefriersubstitution (Marienfeld *et al.*, 1997). Die Zellen wurden in flüssigem Propan schockgefroren und das Wasser drei Tage bei -80 °C durch wasserfreies Aceton (mit 1 % (w/v) Osmiumtetroxid) ersetzt. Hierbei wurde das Substitutionsmedium einmal gewechselt. Nach Transfer auf -20 °C wurde das Medium durch frisches wasserfreies Aceton ersetzt. Die Proben wurden zweimal mit Aceton nachgewaschen, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und noch zweimal mit trockenem Aceton gewaschen. Das Präparat wurde 12 h mit einer 2:1 Aceton/ Spurr (Serva)-Mischung infiltriert und danach das Aceton innerhalb von 24 h durch Evaporation beseitigt. Die Proben wurden in frisches Spurr Medium eingebettet und dieses 24 bei 60 °C polymerisiert. Vom eingebetteten Präparat wurden mit einem Diamantmesser auf einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert) Dünnschnitte (50 - 70 nm) angefertigt, auf mit Piloform beschichteten Kupfergrids aufgebracht und mit Uranylacetat (2 % in Methanol) und Bleicitrat nachkontrastiert (Reynolds, 1963). Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Zeiss EM 10A Elektronenmikroskop bei Vergrößerungen zwischen 25.000fach und 50.000fach. Morphometrische Analysen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach Einscannen mit hoher Auflösung (300 dpi) mit Hilfe des *Image Processing* Programmes KS 400 Vs. 2.0 (Kontron).

III. Ergebnisse

Neben den spezifischen Reaktionsschritten der Riboflavinbiosynthese spielt der Transport von Riboflavin für die effektive Riboflavinproduktion eine zentrale Rolle. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung des Riboflavintransports in *A. gossypii* gliedert sich einerseits in biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Riboflavin-Transportvorgänge und andererseits in die Aufklärung der Adaptationsmechanismen an hyperosmotischen Streß. Hyperosmotischer Streß tritt im natürlichen Habitat des Pilzes, insbesondere aber während der Fermentation auf, und führt nachweislich zu einer Erniedrigung der Riboflavinexkretion. Mit dem Ziel, Stämme mit verbesserter Riboflavinexkretion zu konstruieren, wurden in der vorliegenden Arbeit weiterhin für die Riboflavinexkretion entscheidende Transportprozesse in *A. gossypii* analysiert. Hierbei wurden Aufnahme- und Exportaktivität von Zellen des Wildtyps sowie verschiedener, zur Verfügung stehender Mutanten charakterisiert.

1. Biochemische und physiologische Adaptation von *A. gossypii* an hyperosmotischen Streß

Wachstum, Metabolismus und Reproduktion (Sporulation) in Pilzen und Hefen sind abhängig von der Verfügbarkeit von Wasser, die unter wechselnden Umweltbedingungen aber auch während *fed-batch*-Fermentationsprozessen stark schwanken kann. Ziel der Arbeiten war es daher, *A. gossypii* auf seine Toleranz gegenüber erhöhten externen Salz- und Zuckerkonzentrationen zu untersuchen und hierbei das Spektrum akkumulierter osmoprotektiver Substanzen sowie deren Herkunft (Transport und/ oder Biosynthese) aufzuklären.

1.1. Effekte von hyperosmotischem Streß auf Wachstum und Morphologie der Zellen sowie auf die Riboflavinproduktion

Durch Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß hyperosmotischer Streß, insbesondere aber Salz-Streß (NaCl) zu einer verminderten Riboflavinproduktion in *A. gossypii* führt (Abb. 4).

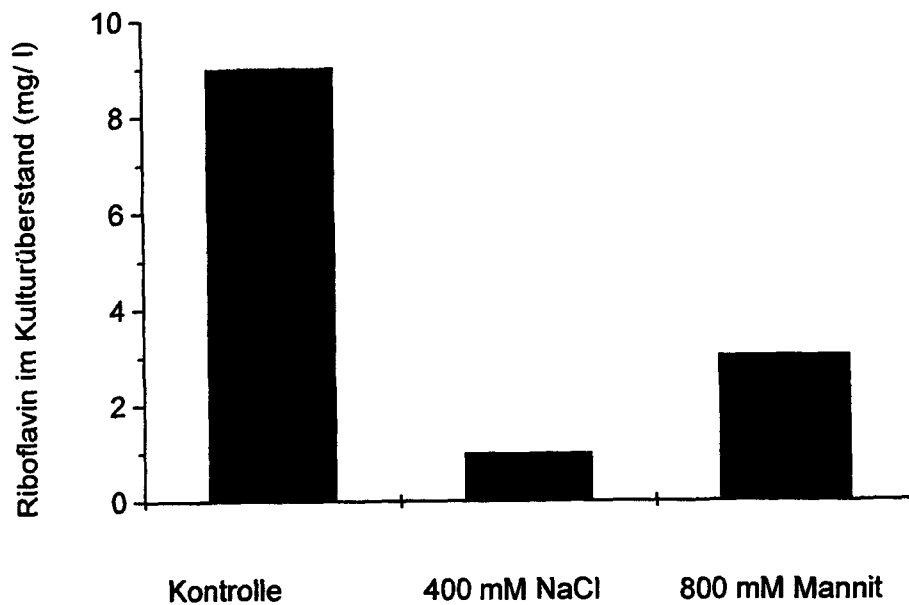


Abb. 4: Riboflavin-Produktion von *A. gossypii* unter hyperosmotischen Bedingungen

Es wurden dementsprechend die Effekte von Salz-Streß und hyperosmotischem Streß auf Wachstum und Morphologie von *A. gossypii* untersucht und miteinander verglichen. Hierbei repräsentiert die NaCl-Belastung eine Kombination aus hyperosmotischem Streß und Salzstreß, das Wachstum auf dem nicht-fermentierbaren Polyol Mannit (Batra, 1973) gab das Adaptationsverhalten der Zellen an reinen hyperosmotischen Streß wider. In den Wachstumsversuchen wurden die Dauer der *Lag*-Phase, die Wachstumsrate und die gebildete Biomasse bestimmt (Tab. 8).

Tab. 8: Wachstumsparameter von *Ashbya gossypii* auf HA-Medium (s. II.3.) mit verschiedenen osmotisch wirksamen Zusätzen

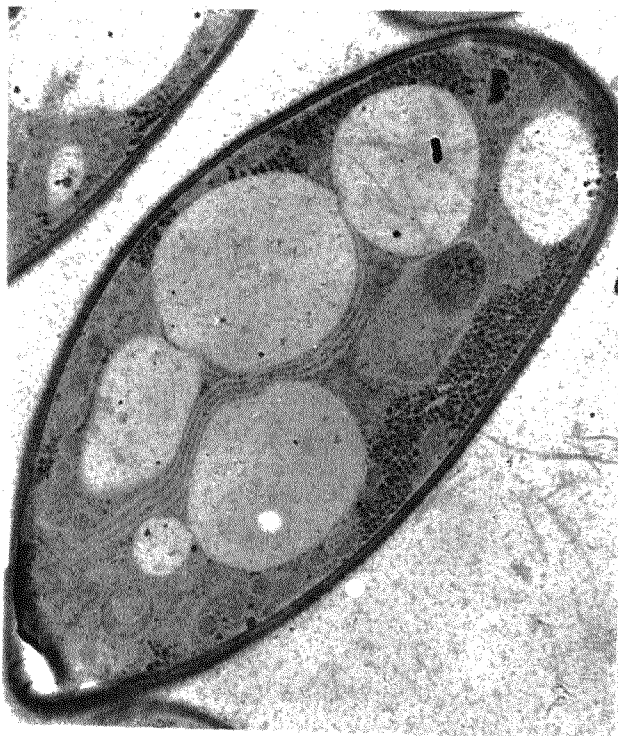
Zusatz	Osmolalität des Mediums (mosm/ l)	Biotrockenmasse nach 24 h (g/ l)	Lag-Phase (h)	Wachstumsrate μ (h^{-1})
kein	150	$5,7 \pm 0,2$	$5 \pm 0,5$	$0,61 \pm 0,03$
0,4 M Mannit	528	$4,9 \pm 0,3$	$5 \pm 0,5$	$0,48 \pm 0,03$
0,8 M Mannit	931	$3,7 \pm 0,5$	$6 \pm 0,8$	$0,40 \pm 0,04$
0,8 M Mannit +				
0,8 M Sorbit	1760	$2,1 \pm 0,6$	$9 \pm 2,0$	$0,22 \pm 0,06$
0,2 M NaCl	554	$2,5 \pm 0,5$	$6 \pm 0,9$	$0,30 \pm 0,05$
0,4 M NaCl	860	$2,1 \pm 0,6$	$7 \pm 1,3$	$0,22 \pm 0,07$
0,8 M NaCl	1572	$0,4 \pm 0,3$	$11 \pm 3,0$	$0,17 \pm 0,08$
0,4 M KCl	832	$4,7 \pm 1,1$	$6 \pm 2,0$	$0,45 \pm 0,03$
0,27 M Na_3PO_4	930	$1,9 \pm 0,6$	$8 \pm 2,4$	$0,19 \pm 0,07$

Eine Erhöhung der Osmolalität des Mediums von 150 mosmol/ l auf etwa 900 mosmol/ l durch Zusatz von 0,4 M NaCl bzw. 0,8 M Mannit verlängerte die *Lag-Phase* um 1 - 2 Stunden (Tab. 8). Die Wachstumsrate NaCl-behandelter Zellen war um 64 % niedriger als die der Kontrolle, während eine Mannit-Belastung gleicher Osmolalität nur einen geringen Effekt auf die Wachstumsrate zeigte. In beiden Fällen war die Ausbeute an Biotrockenmasse signifikant erniedrigt. Die Reaktion der Zellen auf Salzstreß war jedoch deutlicher als die auf Mannit-Streß: 0,8 M Mannit + 0,8 M Sorbit (begrenzte Löslichkeit von Mannit) mit einer Gesamtosmolalität im Medium von 1760 mosmol/ l erniedrigten die Biotrockenmasse-Ausbeute auf 44 %, wohingegen NaCl-Zusatz schon bei 0,2 M (554 mosmol/ l) einen vergleichbaren Effekt zeigte. Um schließlich zwischen Na^+ - und Cl^- -Streß zu differenzieren, also die toxische Komponente der Verbindung NaCl zu definieren, wurden die Zellen in hyperosmotischen Medien, die verschiedene Na^+ - und Cl^- -Salze gleicher Osmolalität enthielten (NaCl, KCl und Na_3PO_4), angezogen (Tab. 8). Während KCl-Zusatz das Wachstum der Zellen genauso wenig beeinflusste wie Mannit-Zusatz gleicher Osmolalität, zeigten sowohl NaCl als auch Na_3PO_4 einen starken Effekt. Diese Ergebnisse wiesen auf Toxizität hoher Na^+ -Konzentrationen für *A. gossypii*-Zellen zusätzlich zu den osmotischen Effekten von NaCl hin.

Der Einfluß hyperosmotischer Bedingungen auf die Morphologie von *A. gossypii*-Zellen wurde mithilfe der Elektronenmikroskopie analysiert. Zellen wurden über Nacht in HA-Medium oder HA-Medium plus 400 mM NaCl oder 800 mM Mannit angezogen und für die

Elektronenmikroskopie präpariert (s. II.8.2.). Die primäre Reaktion der Zellen auf Osmostreß bestand darin, Wasser an das hyperosmolale Medium abzugeben und die Vakuolen zu fraktionieren. Eine wichtige physiologische Funktion der Vakuole in Pilzen und Pflanzen ist die Aufrechterhaltung der osmotischen Verhältnisse in der Zelle, wodurch dieser unter wechselnden Bedingungen die nötige Turgeszenz erhalten wird. Die Fraktionierung der Vakuole als schnelle Reaktion der Zelle auf hyperosmotischen Streß verringert das vakuoläre Volumen, hält aber die Membranoberfläche konstant. Durch die Fraktionierung der Vakuolen ist Wassereinstrom als Primärreaktion auf hyperosmotischen Streß in den cytoplasmatischen Raum ohne den Verlust von Membranoberfläche möglich. Nach 24 h Wachstum zeigten sowohl Kontrollen als auch Mannit-gezogene Zellen wenige, raumfüllende Vakuolen mit bis zu 12 µm Durchmesser, die etwa $50 \pm 11,6$ % des gesamten Zellinnenvolumens ausmachten (**Abb. 5A**). Im Gegensatz dazu bestand das vakuoläre System NaCl-behandelter Zellen aus zahlreichen kleinen Vakuolen von 3 - 4 µm Durchmesser, die nur $35,4 \pm 5,1$ % des Zellinnenvolumens ausmachten (**Abb. 5B**). Über Serienschnitte konnte statistisch ermittelt werden, daß das Gesamt-Zellvolumen unter hyperosmotischem Streß unverändert blieb.

A



B

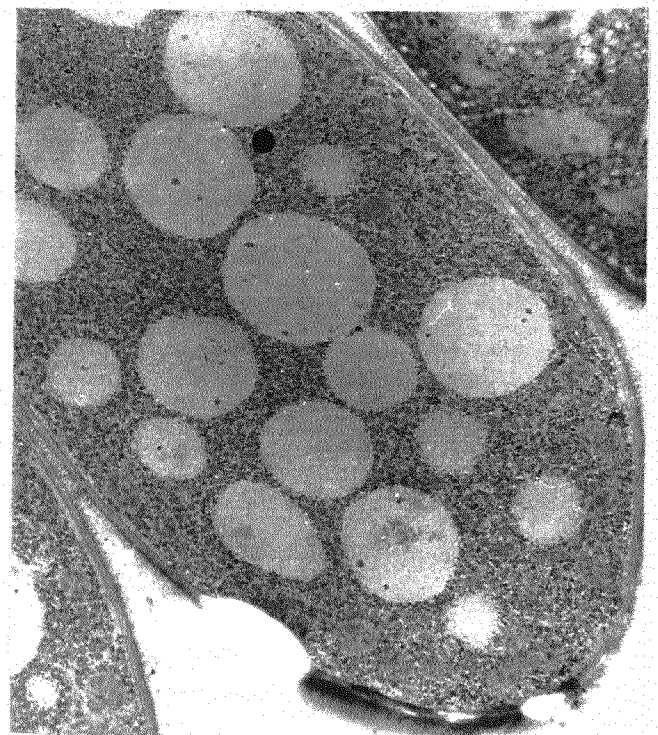


Abb. 5: Dünnschnitte von Hyphen von *A. gossypii* nach Wachstum auf (A) HA-Vollmedium und (B) HA plus 400 mM NaCl. Der Eichstrich entspricht 2 µm.

1.2. Akkumulation kompatibler Solute und anorganischer Ionen

Die unter hyperosmotischen Bedingungen intrazellulär akkumulierten kompatiblen Solute wurden über ^1H -NMR identifiziert (s. II.7). Unter Hochsalz-Bedingungen akkumulierte *A. gossypii* als prädominante osmoprotektive Substanz Glycerin (**Abb. 6B**), wohingegen es in Kontroll-Zellen nicht detektierbar war (**Abb. 6A**). Das Ausmaß der Glycerinakkumulation war hierbei proportional dem Salzgehalt im Medium (**Tab. 9**).

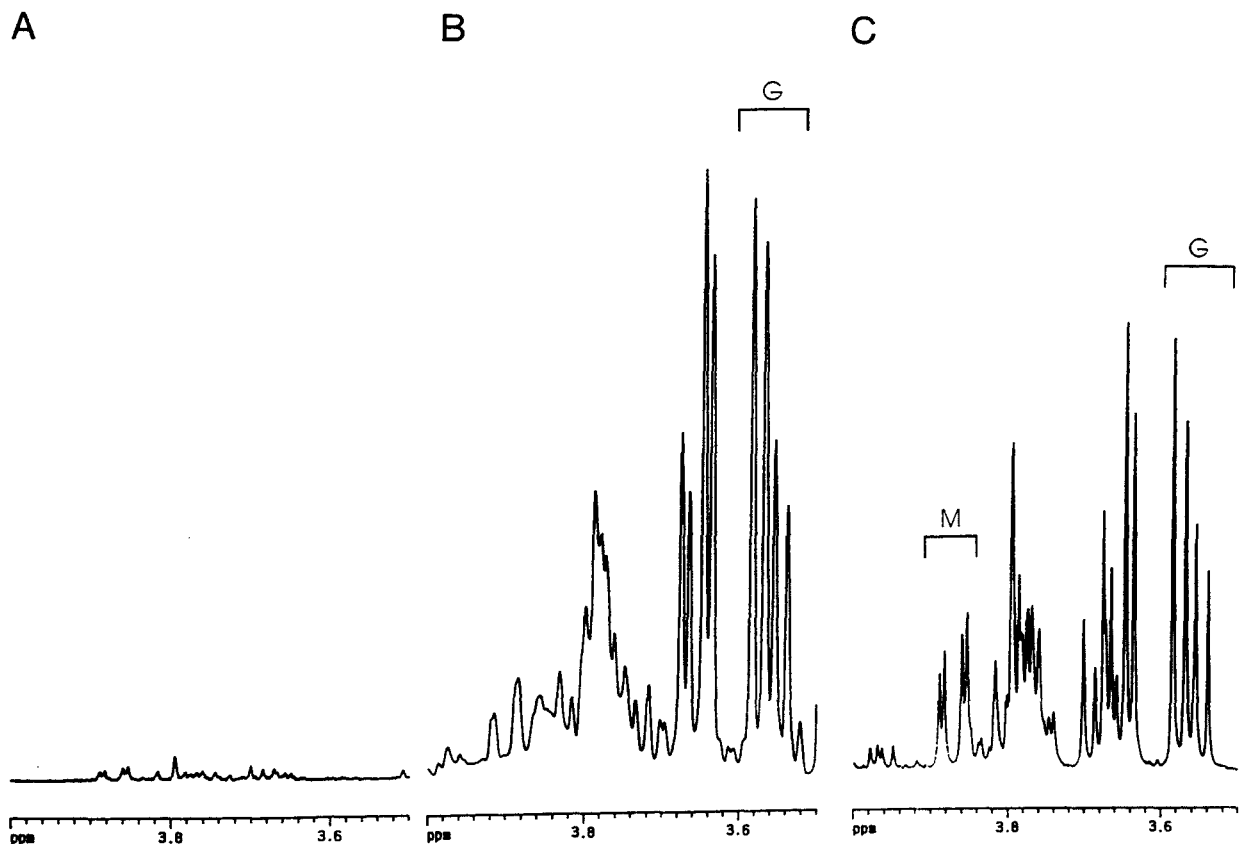


Abb. 6A,B,C: ^1H -NMR-Spektren organischer kompatibler Solute von *A. gossypii* nach Wachstum auf Medien mit verschiedenen osmotisch wirksamen Zusätzen (**A**) HA-Medium, (**B**) HA plus 400 mM NaCl und (**C**) HA plus 800 mM Mannit

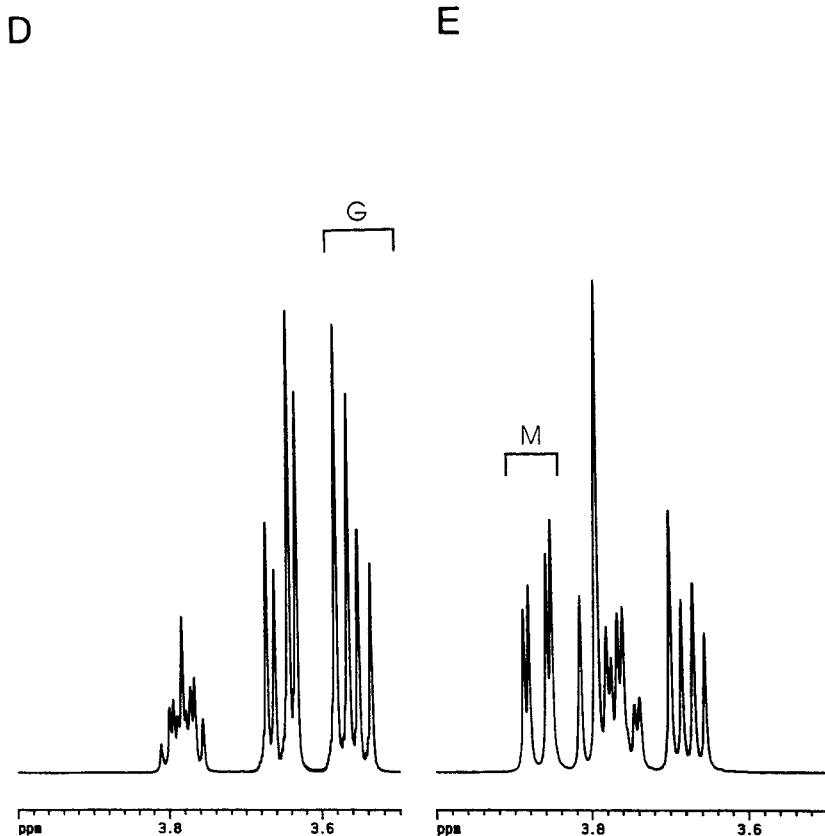


Abb. 6D,E: ^1H -NMR-Spektren von reinem Glyzerin (**D**) und reinem Mannit (**E**). Die ^1H -NMR-Resonanzen, die ein einfaches Zuordnen der Signale in den Spektren A - C erlaubten, wurden mit G (Glyzerin) und M (Mannit) gekennzeichnet.

Außerdem wurde die Gesamtosmolalität der Zellextrakte nach Wachstum auf NaCl-haltigem Medium bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß Glyzerin das vorherrschende Osmoprotektans in *A. gossypii*-Zellen darstellt. Glyzerin machte nach 24 h NaCl-Belastung über 85 % der Zunahme an zellinterner Osmolalität aus (**Tab. 9**).

Tab. 9: Osmolalität der Zellextrakte von *Ashbya gossypii* sowie ihr Gehalt an kompatiblen Soluten und anorganischen Ionen nach 20-stündigem Wachstum auf Medien mit verschiedenen osmotisch wirksamen Zusätzen

Parameter		Zusätze [mM]				
		ohne	NaCl	NaCl	Mannit	Mannit
			200	400	400	800
Medien	Osmolalität [mOsm]	150	554	860	528	931
	Mannit* [mM]	< 1	< 1	< 1	400	800
	Glyzerin * [mM]	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Zellextrakte	Osmolalität [mOsm]	227	650	935	670	965
	Mannit * [mM]	<1	<1	<1	150	117
	Glyzerin [mM]	3,5	345	590	200	460
	K ⁺ [mM]	50	47	43	41	42
	Na ⁺ [mM]	35	41	41	33	37
	Cl ⁻ [mM]	21	38	38	29	37
Glyzerin-	intern/ extern	> 3,5	> 345	> 590	> 200	> 460
Akkumulation						
Mannit-	intern/ extern	-	-	-	0,37	0,15
Akkumulation						

* < 1 mM (Nachweisgrenze für die betreffenden Substanzen über ¹H-NMR Spektroskopie)

Steigende Osmolalität im Medium durch Mannit-Zusatz führte zu erhöhten internen Konzentrationen an Mannit und zusätzlich zur Akkumulation von Glyzerin (**Abb. 6C**). Die intrazellulär gespeicherte Glyzerinmenge stieg wieder proportional zur Osmolalität des Wachstumsmediums an, wohingegen die zellulären Mannitkonzentrationen in keinem Fall 150 mM überschritten (**Tab. 9**). Die gemessenen internen Glyzerinkonzentrationen machten etwa 80 % der Steigerung der Osmolalität im Zellextrakt unter hyperosmotischem Streß aus (**Tab. 9**), extern lagen die Glyzerinkonzentrationen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von 1 mM. Im Gegensatz dazu waren die intrazelluläre Mannit-Akkumulation nur gering (**Tab. 9**). Andere organische Substanzen (andere Polyole, Trehalose, Aminosäuren) konnten über ¹H-NMR-Spektroskopie nach Wachstum auf hochosmolalen Medien nicht in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die intrazellulären Gehalte an anorganischen Ionen bei Wachstum auf HA-Vollmedium und auf hochosmolalen Medien (HA plus NaCl bzw. Mannit) verglichen (**Tab. 9**). Die zellinternen K⁺-Konzentrationen betrugen ungefähr 50 mM und blieben auch unter NaCl- oder Mannit-Streß unverändert. Na⁺ und Cl⁻ Konzentrationen wurden selbst unter hoher NaCl-Belastung von der Zelle konstant gehalten. Intrazelluläre SO₄²⁻-(4,2 mM) und PO₄³⁻-(36,5 mM) Konzentrationen

addierten sich zu ungefähr 40 mM, unabhängig von der extern angebotenen Osmolalität. Zusammenfassend demonstrieren diese Meßergebnisse, daß die Zunahme in der zellulären Osmolalität von *A. gossypii* unter hyperosmotischer Belastung zu 80 % durch Glycerin oder eine Kombination von Glycerin und Mannit, abhängig von der osmotisch wirksamen Substanz, ausgeglichen wurde.

1.3. Glycerin-Aufnahme oder *de novo*-Biosynthese?

Akkumulation kompatibler Solute unter hyperosmotischem Streß kann durch Aufnahme oder durch *de novo*-Biosynthese erklärt werden. Zunächst wurde die Existenz eines Transportsystems für das vorherrschende Osmoprotektans Glycerin in *Ashbya* überprüft, indem die Aufnahme von Glycerin in osmotisch nicht-belasteten Zellen durch Zugabe radioaktiv markierten Substrates nachgewiesen wurde. Die Bestimmung der kinetischen Parameter der Glycerinaufnahme in osmotisch nicht-belasteten Zellen wies auf ein Aufnahmesystem hoher Aktivität hin. Abb. 7 zeigt eine für die erhaltenen Daten repräsentative Einzelkinetik bei einer Substratkonzentration von 50 μM : die Glycerinaufnahme verläuft hyperbolisch (Sättigungskinetik), die Aufnahmegeschwindigkeit bei 50 μM Glycerin wurde aus der Anfangssteigung zu etwa $12 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ berechnet.

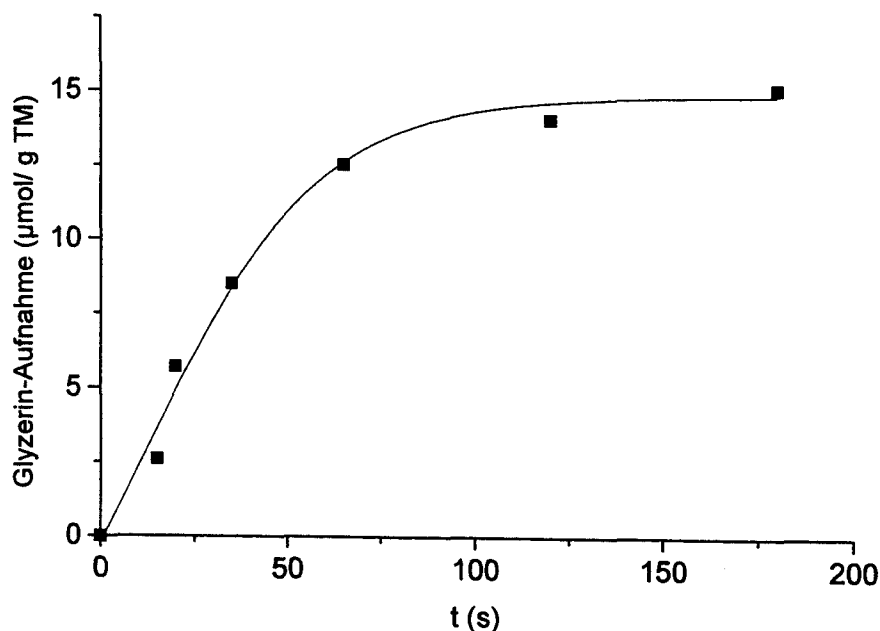


Abb. 7: Glycerinaufnahme bei 50 μM Glycerin, *A. gossypii*, WT

Die Michaelis-Menten-Analyse einer Serie solcher Einzelkinetiken in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ergab eine Substrataffinität (K_M -Wert) von 80 μM sowie eine maximale Aufnahmegeschwindigkeit (V_{max}) von $35 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ für das Glycerin-

aufnahmesystem (Abb. 8A). Diese kinetischen Parameter waren unbeeinflusst davon, ob während des Wachstums Glycerin als C-Quelle angeboten wurde, das Glycerinaufnahmesystem scheint dementsprechend in *A. gossypii* konstitutiv exprimiert. Die Glycerinaufnahmeaktivität osmotisch belasteter Zellen wurde unter zwei unterschiedlichen Bedingungen getestet: der Aufnahmeassay wurde an osmotisch adaptierten Zellen (Anzucht in hyperosmolalen Medien) und an nicht-adaptierten Zellen jeweils unter osmotischer Belastung durchgeführt. In adaptierten Zellen wurde die Glycerin-Aufnahmeaktivität wider Erwarten fast vollständig herunterreguliert, der apparente V_{\max} sank sowohl für an NaCl als auch für an Mannit adaptierten Zellen auf einen Wert von $1,4 \pm 0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ (Abb. 8B). Der K_M -Wert blieb durch Anzucht unter hyperosmotischem Streß unbeeinflusst.

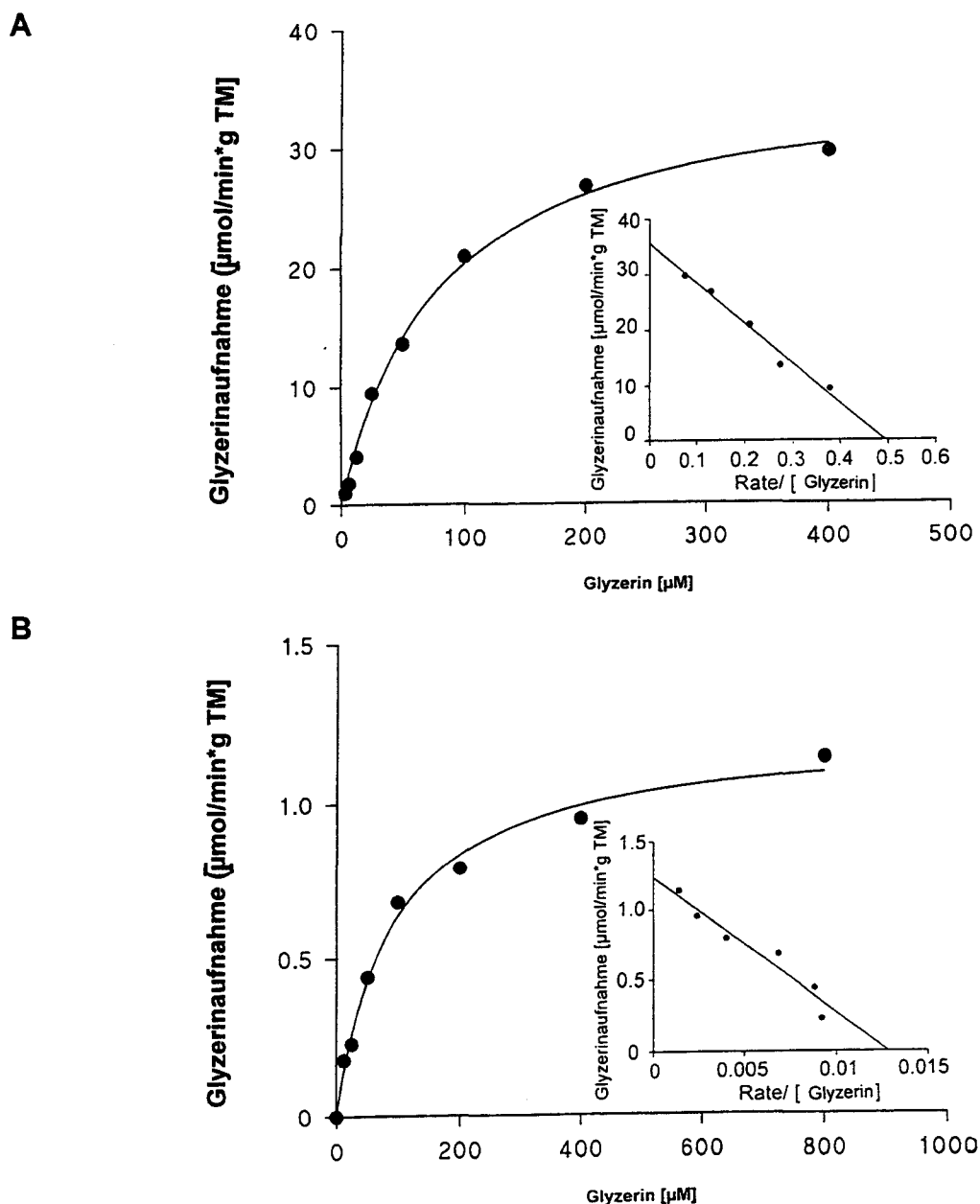


Abb. 8: Kinetische Analyse der Glycerinaufnahme von *A. gossypii*-Zellen nach Wachstum auf (A) HA-Vollmedium und (B) HA plus 800 mM Mannit

III. ERGEBNISSE

Im Gegensatz dazu führte die Kurzzeitbelastung nicht-adaptierter Zellen mit NaCl oder Mannit nicht zu einer veränderten Glycerin-Aufnahmeaktivität (**Abb. 9**). Kurzzeitbelastung wurde durch eine 2-minütige Präinkubation der Zellen in NaP_i Puffer hoher Osmolalität vor Starten der Aufnahmemessung erreicht.

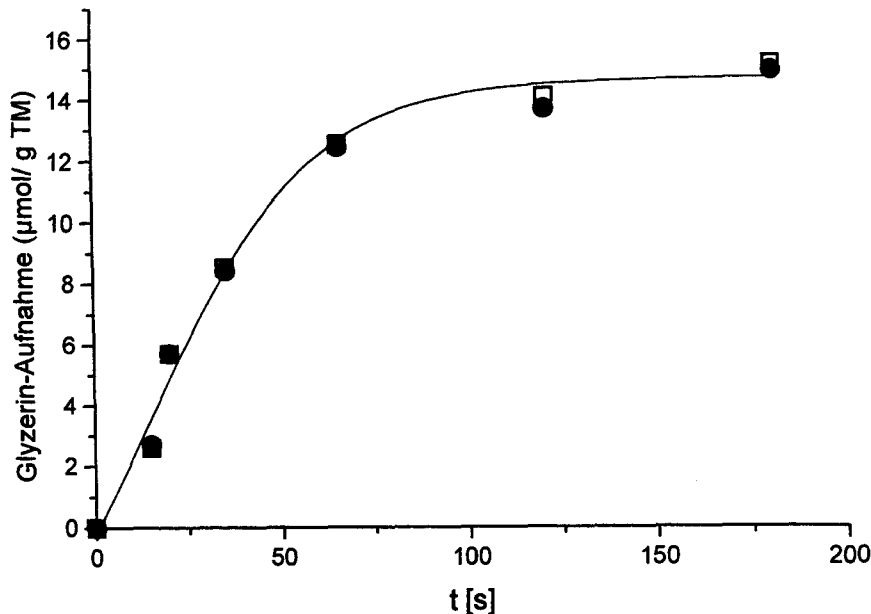


Abb. 9: Glycerinaufnahme unbelasteter Zellen (□) und bei Kurzzeitbelastung mit 0,8 M Mannit (●)

Durch die Aufnahmeversuche an adaptierten Zellen konnte Glycerin-Aufnahme als Quelle für die Glycerin-Akkumulation ausgeschlossen werden. Dementsprechend wurde Glycerin-Biosynthese zur Bereitstellung des kompatiblen Soluts postuliert. Um diese Hypothese zu stützen, wurden die Zellen in Mannit-haltigen Medien (800 mM) mit oder ohne Zusatz von Glycerin (30 mM) angezogen. Die Glycerin- und Mannitakkumulation wurde über ^1H -NMR-Spektroskopie über den gesamten Wachstumszeitraum spektroskopisch verfolgt. Osmotischer Streß führte schon bald nach Inokulieren der Zellen unter beiden Bedingungen zur Aufnahme von Mannit, wobei das Maximum (ca. 150 mM) bereits in der frühen logarithmischen Phase erreicht wurde (**Abb. 10**). Das externe Angebot von Glycerin im Medium beeinflusste die Glycerin-Akkumulation in den Zellen nicht, Glycerin wird also wie angenommen vornehmlich über *de novo*-Biosynthese bereitgestellt (**Abb. 10**).

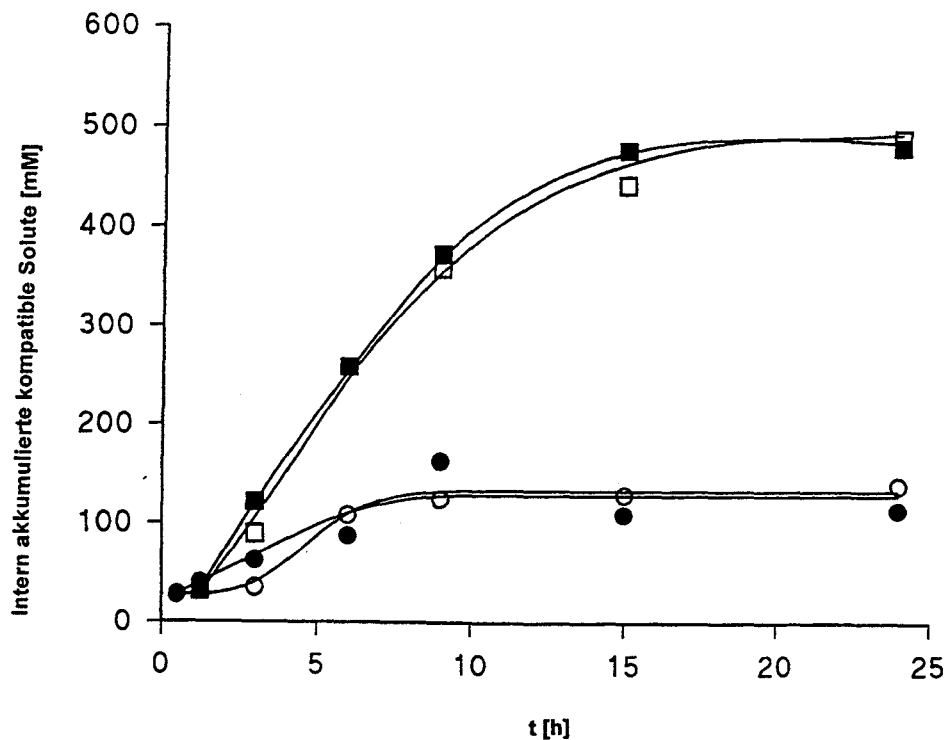


Abb. 10: Zeitverlauf der zellinternen Akkumulation der kompatiblen Solute Glycerin und Mannit in *A. gossypii* beim Wachstum auf HA-Medium plus 800 mM Mannit in Gegenwart (□ ○) oder Abwesenheit (■ ●) von 30 mM Glycerin. □ ■ Glycerin, ○ ● Mannit.

Unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen war dementsprechend erhöhte Aktivität von Enzymen der Glycerin-Biosynthese zu erwarten. Die Aktivität des Schlüsselenzyms der Glycerinbiosynthese, der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8; GPDH), wurde im Zellextrakt während des Wachstums auf Medien bestimmt, die NaCl oder Mannit (400 mM bzw. 800 mM) enthielten. Die GPDH-Aktivität stieg während der ersten 30 bis 60 min nach Inokulieren der Zellen in die hyperosmotischen Medien an und erreichte ihren Endwert in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Das Ausmaß der GPDH-Aktivierung hing hierbei sowohl von Art der osmotisch wirksamen Substanz (NaCl, Mannit) als auch von der angebotenen Osmolalität ab. Die gemessene Aktivität war in NaCl-belasteten Zellen höher als in Mannit-belasteten Zellen (Tab. 10). Mittlere osmotische Belastung (400 mOsm) führte außerdem in beiden Fällen zu einer stärkeren Aktivierung der GPDH als hohe externe Osmolalität (800 mOsm) (Tab. 10).

Tab. 10: Spezifische GPDH Aktivität in Zellextrakten nach Wachstum in verschiedenen hyperosmolalen Medien

Zusatz	Osmolalität im Medium [mOsm]	GPDH Aktivität [U/ mg Protein]
kein	150	0,050
0,2 M NaCl	554	0,320
0,4 M NaCl	860	0,245
0,4 M Mannit	528	0,175
0,8 M Mannit	931	0,148

2. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum Riboflavintransport

A. gossypii produziert und exportiert bei Wachstum auf Produktionsmedium (s. II.3.) beträchtliche Mengen an Riboflavin. Grundlegend für die Konstruktion von Stämmen mit noch höherer Exporteffizienz ist eine Charakterisierung der vorliegenden Riboflavin-Transportprozesse über die verschiedenen Zellmembranen. Ein großer Anteil der Gesamtproduktion des Vitamins kann beispielsweise lichtmikroskopisch in der Vakuole des Pilzes nachgewiesen werden (s. Abb. 1) und macht für die Produktion weitere Aufreinigungsschritte zur Gewinnung des Produktes erforderlich. Die durchgeführten Untersuchungen zum Riboflavintransport gliedern sich daher in Transportmessungen an intakten Hyphenzellen und in Analysen der vakuolären Akkumulation von Riboflavin in *A. gossypii*.

2.1. Riboflavintransport an intakten Zellen

Aufnahme und Exkretion von Riboflavin wurden hinsichtlich kinetischer und energetischer Parameter an intakten Hyphenzellen untersucht. Hierzu wurden die Raten von Riboflavinaufnahme und -efflux, die Spezifität der Transportprozesse sowie die Abhängigkeit des Effluxes vom Energiestatus der Zelle und vom Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum bestimmt.

2.1.1. Riboflavinaufnahme

Zur Charakterisierung der Riboflavinaufnahme wurden Zellen der Riboflavin-auxotrophen Mutante Lu441 eingesetzt. Mithilfe der Technik der schnellen Filtration (s. II.4.11.) konnten Aufnahmekinetiken in Abhängigkeit von der extern angebotenen Riboflavinkonzentration gemessen werden. Aufgrund der beschränkten Löslichkeit von Riboflavin (Löslichkeitsgrenze in Wasser: 133 μM) ließen sich keine Aufnahmezeiten über 120 μM Riboflavin messen. Die Riboflavinaufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigte Sättigungsverhalten (**Abb. 18**). Über nichtlineare Regressionsanalyse nach Michaelis-Menten wurden eine Maximalgeschwindigkeit der Aufnahme von $20 \pm 4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ (V_{max}) und eine apparente Transportaffinität (K_{M}) von $40 \pm 12 \mu\text{M}$ bestimmt (**Abb. 11**).

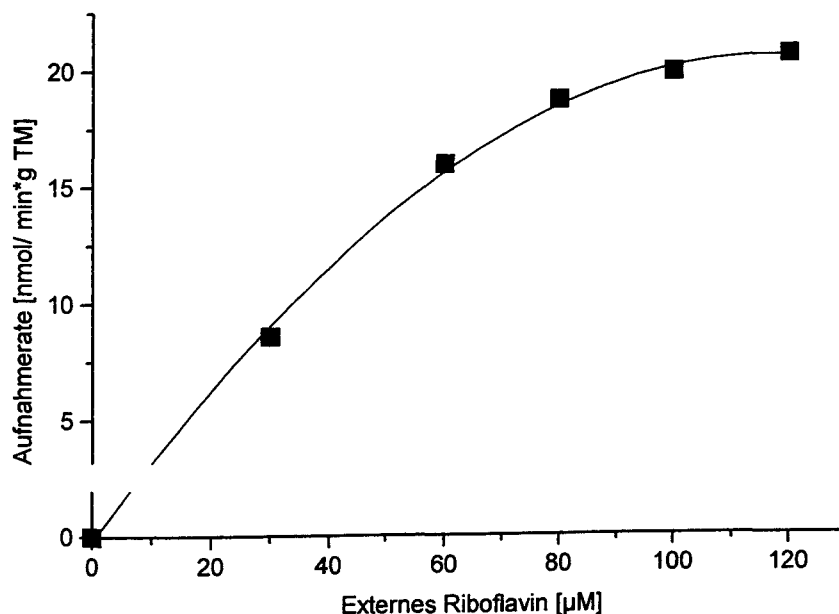


Abb. 11: Riboflavinaufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in *A. gossypii* Lu441. Die externe Riboflavinkonzentration wurde im Transporttest von 30 bis 120 μM variiert.

Die kinetischen Parameter der Riboflavinaufnahme schließen passive Diffusion als Mechanismus der Aufnahme aus. Um weitere Argumente für einen aktiven energieabhängigen Transportmechanismus zu erhalten, wurde der Effekt des Protonophors 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Riboflavinaufnahme untersucht. DNP ist eine lipophile, gut membrangängige Substanz, deren Zugabe zur Dissipation von elektrochemischen Protonengradienten führt. Die entkoppelnde Wirkung von DNP auf energieabhängige Transportvorgänge in *Ashbya* war in einem Kontrollexperiment mit dem energieabhängig transportierten Substrat Desoxyglucose nachgewiesen worden (Korte und Krämer,

III. ERGEBNISSE

unveröffentlichte Daten). Bei Zugabe des Entkopplers DNP in einer Konzentration von 2 mM wurde eine sofortige Erniedrigung der Riboflavinaufnahme beobachtet (**Abb. 12**). Dies bedeutet, daß ein energieabhängiger Aufnahme-prozeß von Riboflavin in *A. gossypii* gefordert werden muß.

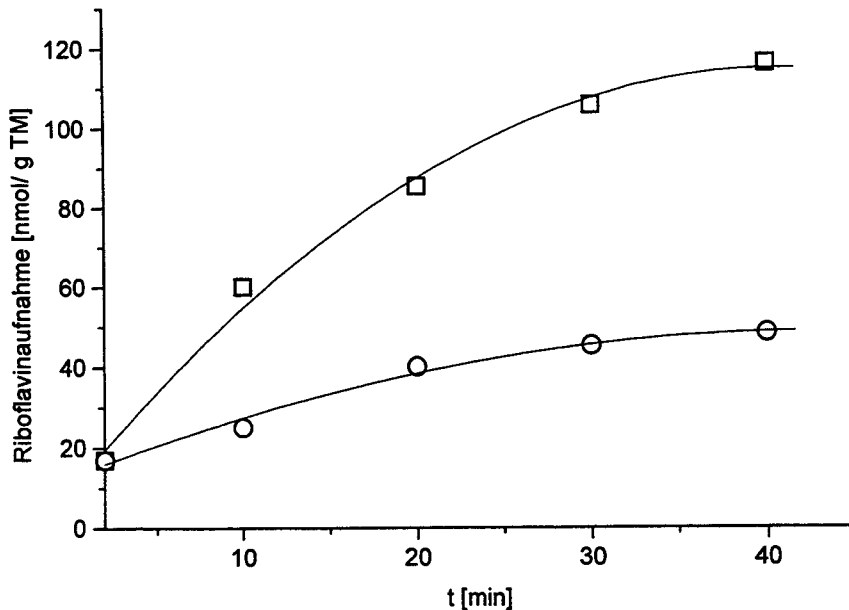


Abb. 12: Einfluß des Protonophors DNP auf die Riboflavinaufnahme von *A. gossypii*
□ Kontrolle; ○ 2 mM DNP

Um die Spezifität des Aufnahmesystems zu bestimmen, wurde der Einfluß verschiedener Substratanaloga auf die Riboflavin-Aufnahme getestet (**Abb. 13**). Während die Zugabe von Ribose (die chemische Struktur von Riboflavin enthält einen Ribitylrest) und der strukturell analogen Substanzen Lumiflavin, Lumazin und Arabinoflavin keinen Effekt auf die Aufnahme zeigten, führte die Zugabe der vom Riboflavin abgeleiteten Nukleotide FAD und vor allem FMN zu einer starken kompetitiven Hemmung der Riboflavinaufnahme (**Abb. 13**).

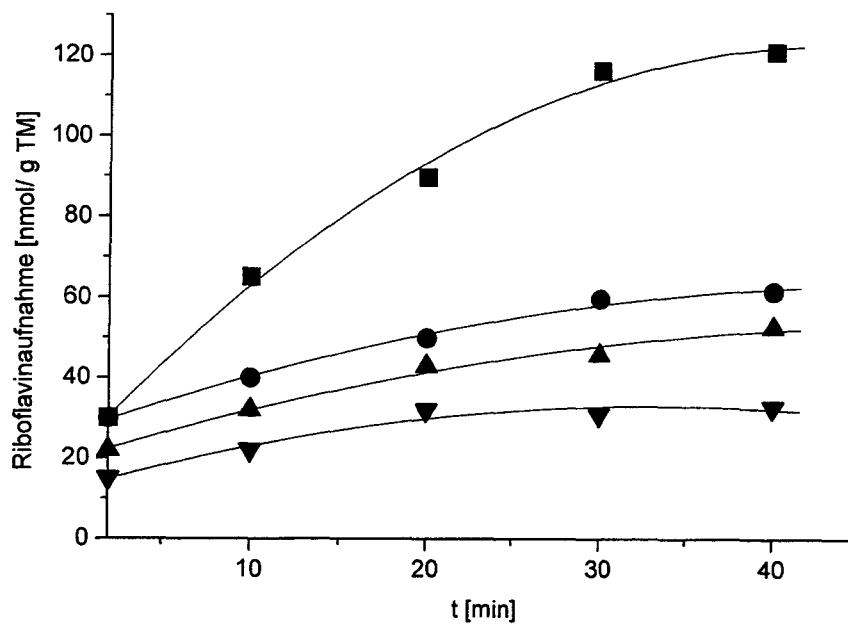


Abb. 13: Kompetitive Hemmung der Riboflavinaufnahme durch FMN und FAD

■ Kontrolle; ● 1 mM FAD; ▲ 5 mM FAD; ▼ 1 mM FMN

Weitere Messungen in *A. gossypii* ergaben, daß die Riboflavinaufnahme keine Abhängigkeit von Natriumionen zeigt und nicht durch Anwesenheit verschiedener Zucker beeinflusst wird. Zusammenfassend wurde gezeigt, daß *A. gossypii* ein energieabhängiges spezifisches Aufnahmesystem für Riboflavin besitzt, das sich durch eine relativ hohe Affinität jedoch eine sehr niedrige Aktivität auszeichnet.

2.1.2. Efflux von Riboflavin

2.1.2.1. Veränderung der Exkretionsaktivität durch Variation der Kulturbedingungen und der intrazellulären ATP-Konzentration

Durch Messung der externen Riboflavinkonzentration in geeigneten zeitlichen Abständen ließen sich gut auswertbare Kinetiken der Riboflavinexkretion während der Fermentation auf Produktionsmedium gewinnen. Zunächst wurde das Exportverhalten von *A. gossypii* ATCC 10895 (WT) und der stärker produzierenden Mutante ItaGS01 verglichen (**Abb. 14**).

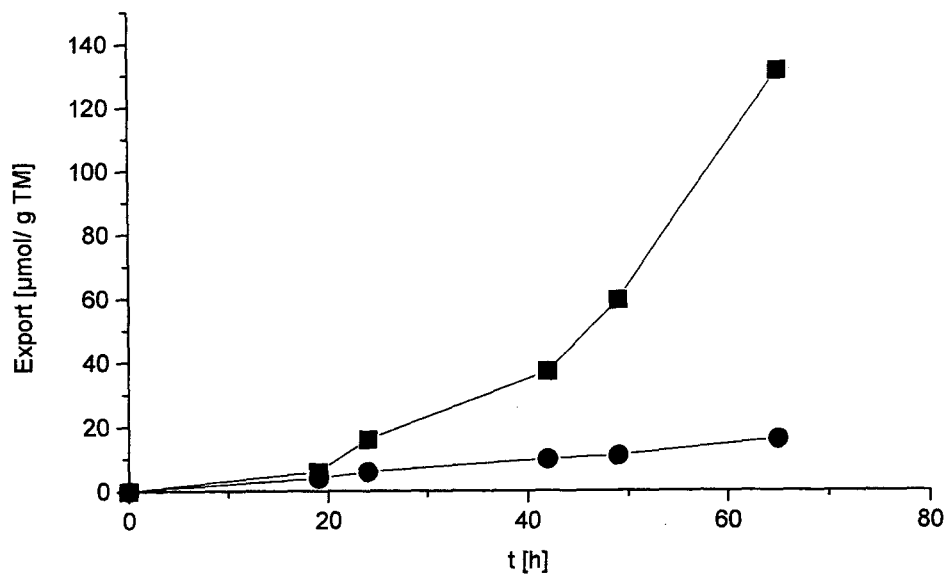


Abb. 14: Riboflavinexport der Stämme ● ATCC 10895 (WT) und ■ ItaGS01 bei Standardfermentation auf Produktionsmedium.

Beide Stämme begannen mit der Riboflavinexkretion ins Produktionsmedium in der stationären Phase nach Beenden des Wachstums (20 h-Kultur). Der Efflux von Riboflavin erreichte Raten von bis zu $2,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ beim WT und $58 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ für die Mutante ItaGS01, deren Exkretionsrate ins Medium ein etwa 20faches des WT ausmachte. Während der Produktionsphase war im überproduzierenden Stamm ItaGS01 licht- und fluoreszenzmikroskopisch neben der Exkretion eine starke Akkumulation des Produktes in der Vakuole erkennbar. Zur weitergehenden funktionellen Charakterisierung des Riboflavin-Exkretionssystems wurden Experimente zum Mechanismus und zur Regulation ausschließlich mit der überproduzierenden Mutante ItaGS01 durchgeführt, die einen besser meßbaren Efflux von Riboflavin zeigte.

Das Überführen der Zellen im Produktionszustand in C-Quelle-freien NaP_i -Puffer (s. II.4.10.) ermöglichte den experimentellen Zugang zu Kinetik und Energetik der Riboflavinexkretion. Durch diesen Ansatz konnte der Effluxprozeß innerhalb kurzer Zeiträume bei niedrigen Zelldichten und niedrigen externen Riboflavinkonzentrationen untersucht werden. Zunächst wurden die Unterschiede in Produktion und Exportverhalten in Abhängigkeit von der C- und Energiequelle betrachtet.

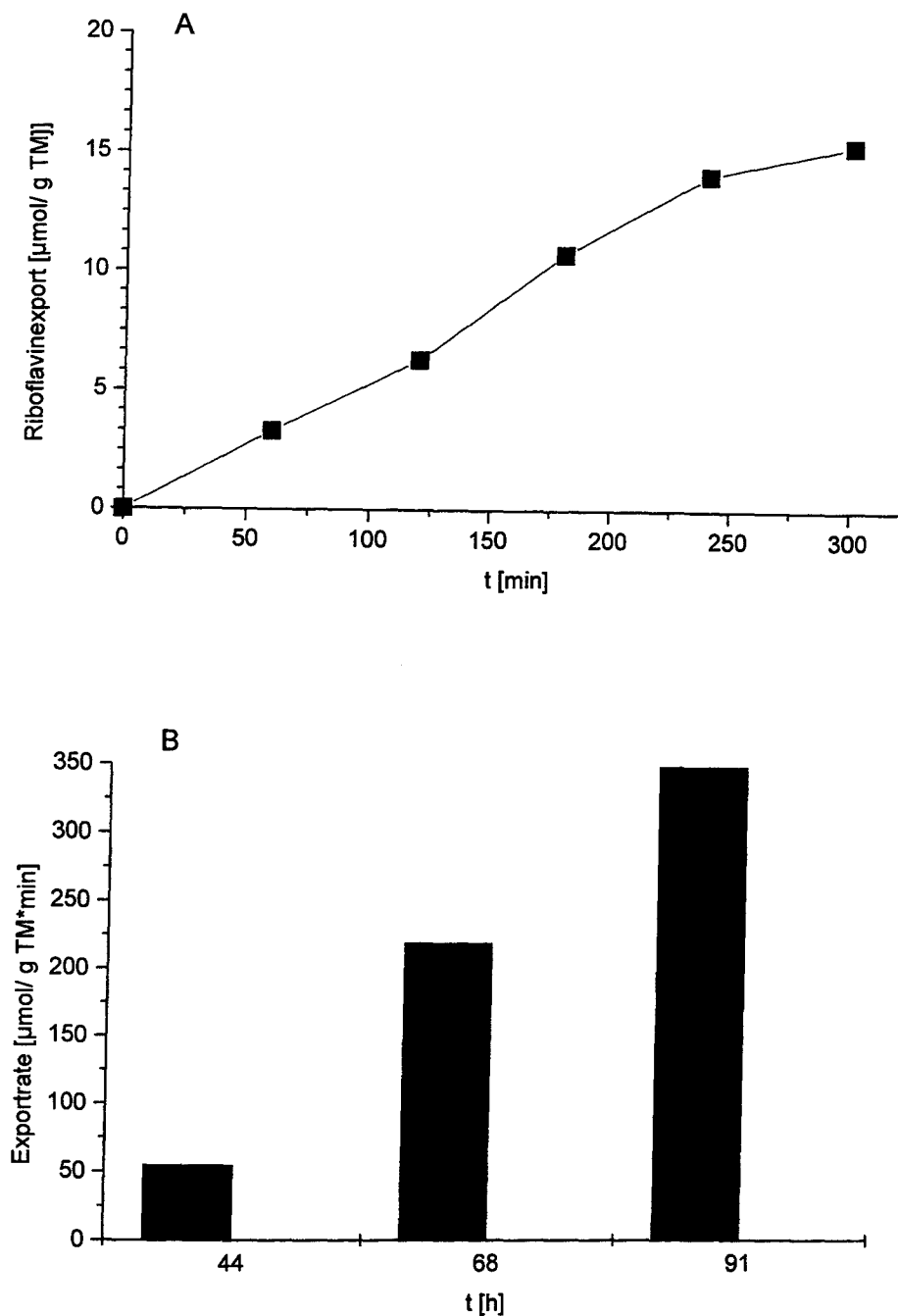


Abb. 15: Riboflavinexport der Mutante ItaGS01 nach Resuspendieren in NaP_i -Puffer, **(A)** Einzelkinetik ItaGS01 nach 44 h auf Sojaöl, **(B)** Exportraten auf Sojaöl in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Abb. 15 A zeigt eine Einzelkinetik Sojaöl-gezogener Zellen nach 44 h Produktion. Aus dem linearen Anfangsbereich ließ sich eine Exportrate von $49 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g TM}^{-1}$ errechnen, die gut mit den direkt aus der Produktion berechneten Exportraten übereinstimmt (s. Abb. 14). Weiterhin wurde die Exportaktivität der Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Kultur

III. ERGEBNISSE

untersucht (**Abb. 15B**). Für diesen Versuch wurden 800 ml Kultur angezogen und im Abstand von etwa 24 h durch Filtration geerntet und zum Exportversuch eingesetzt. **Abb. 15B** macht deutlich, daß die Riboflavinexport-Aktivität abhängig vom Alter der Zellen bzw. der Produktionsphase ist. Die Exportaktivität der Zellen stieg während 90 h Fermentation um ein Mehrfaches.

Die Energieabhängigkeit des Riboflavinefflux wurde durch Variation der Energiequellen (Glucose, Ethanol, Sojaöl) untersucht (**Abb. 16**). Ziel war es, das Exkretionsverhalten, die intrazellulär akkumulierten Riboflavinkonzentrationen und einen energetischen Parameter (ATP) der Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten C-Quelle zu vergleichen. Nach 50 h Wachstum wurde für alle drei Zelltypen ein gleich hoher intrazellulärer Riboflavin-Pool (8 ± 2 mM) bestimmt, das Exportverhalten wurde also bei gleicher intrazellulärer Verfügbarkeit von Riboflavin untersucht. Sojaöl-gezogene Zellen zeigten mit Abstand die schnellste Exportkinetik: die Exportrate betrug 70 ± 10 nmol/min*g TM. Glucose-gezogene Zellen erreichen nur etwa 35 % dieser Exportaktivität, 25 ± 8 nmol/min*g TM. Für Ethanol-gewachsene Zellen war bei gleicher intrazellulärer Riboflavin-Verfügbarkeit nahezu kein Export nach Resuspendieren in ethanolfreiem Puffer nachweisbar (**Abb. 16A**). Es scheint interessant, daß das intrazellulär gespeicherte Riboflavin in Ethanol-gezogenen Zellen zurückgehalten wird. Da die Zellen den hohen nach außen gerichteten Riboflavingradienten über die Plasmamembran über die gesamte Versuchsdauer aufrechterhalten, etwa 10fach über die Plasmamembran und etwa 200fach über den Tonoplasten, konnten Diffusionsprozesse für den Riboflavinefflux ausgeschlossen werden. Die unterschiedliche Exportaktivität der Zellen nach Wachstum auf den drei Wachstumsmedien kann weiterhin ein Hinweis darauf sein, daß die Zellen abhängig von der C-Quelle unterschiedlich energetisiert vorliegen. Dies wurde durch die internen ATP-Werte unter den verschiedenen Bedingungen bestätigt (**Abb. 16B**). Sojaöl-gezogene Zellen enthielten am Ende des Exportversuchs (6 h) $4 \pm 0,8$ mM ATP, in Glucose-gezogene Zellen wurden $1,5 \pm 0,7$ mM ATP nachgewiesen, in Ethanol-gezogenen Zellen lediglich $0,5 \pm 0,35$ mM. Eine andere Erklärung für die unterschiedliche Exportaktivität nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen könnte aber auch eine verschieden starke Expression oder Synthese des Riboflavinexporters sein. Die gemessenen Effekte könnten damit auf Regulation des Riboflavinexports auf Expressionsebene hinweisen.

Um eine mögliche Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Exportaktivität der Zellen auf den verschiedenen Wachstumsmedien zu überprüfen, wurde den auf verschiedenen C-Quellen gezogenen Zellen im Exportversuch Glucose als Energiequelle zugesetzt. Als Marker für den Energiezustand der Zelle wurde wiederum der interne ATP-Gehalt der Zellen bestimmt. **Tab. 11** zeigt die Exportaktivität und den internen ATP-Gehalt Ethanol-, Glucose- und Sojaöl-gezogener Zellen mit und ohne Zusatz von Glucose zum Exportansatz.

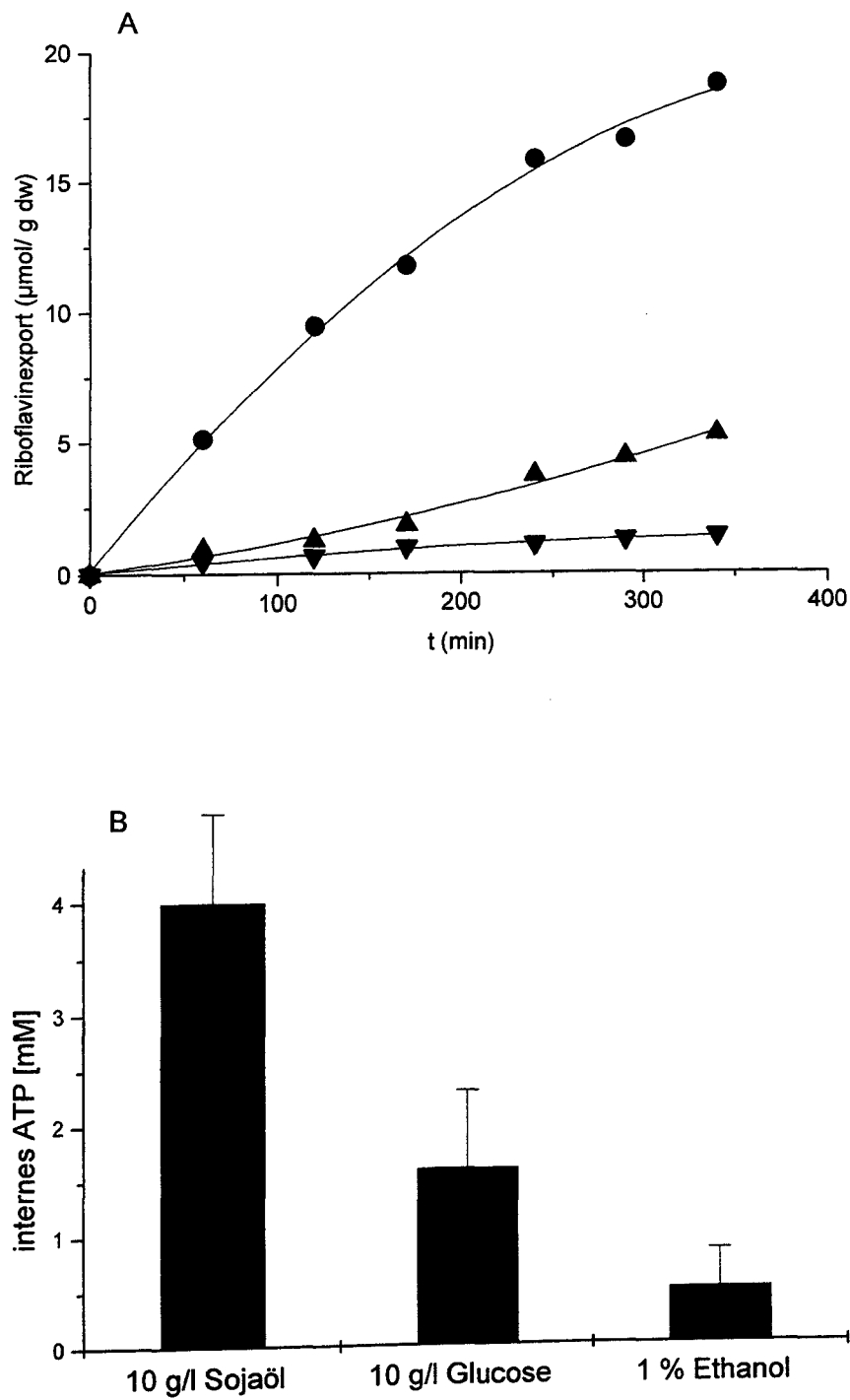


Abb. 16: Riboflavinexport (A) und interner ATP-Gehalt (B) nach 50 h Wachstum in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen, ● 10 % (w/v) Sojaöl ▲ 1 % (w/v) Glucose ▼ 1 % (v/v) Ethanol

Tab. 11: Einfluß von einer zusätzlichen C-Quelle (5 mM Glucose) auf Riboflavinexport und internen ATP-Gehalt

Anzuchtmedium	C-Quelle im Exportversuch			
	keine		5 mM Glucose	
	ATP [mM]	Exportrate [nmol/min*gTM]	ATP [mM]	Exportrate [nmol/min*gTM]
1 % Ethanol	0,5 ± 0,35	1,2 ± 1,0	3,1 ± 0,6	15,2 ± 7,6
1 % Glucose	1,5 ± 0,7	25 ± 8,0	3,8 ± 1,1	47,3 ± 8,0
10 g/l Sojaöl	4,0 ± 0,8	70 ± 10,0	5,9 ± 0,7	66,3 ± 11,0

Ethanol-gezogene Zellen zeigten im Kontrollansatz nahezu keine Exportaktivität und einen sehr niedrigen internen ATP-Spiegel. Durch Zusatz von Glucose konnte die Exportaktivität auf das 7fache und der ATP-Gehalt auf das etwa 5fache des Kontrollansatzes angehoben werden (Tab. 11). Glucose-gezogene Zellen zeigen im Kontrollansatz eine geringe Exportaktivität (25 nmol/min*g TM) und einen internen ATP-Spiegel von 1 - 2 mM. Durch Zusatz von Glucose konnte die Exportaktivität auf das 2fache und der ATP-Gehalt auf das etwa 2,5fache des Kontrollansatzes gesteigert werden (Tab. 11). Sojaöl-gezogene Zellen zeigen im Kontrollansatz bereits eine starke Exportaktivität (70 nmol/min * g TM) und einen vergleichsweise hohen internen ATP-Spiegel von 4 - 5 mM. Durch Zusatz von Glucose konnte die Exportaktivität nicht weiter und der ATP-Gehalt nur geringfügig erhöht werden (Tab. 11). Die mit dem Energiestatus der Zelle korrelierte Exportaktivität weist auf einen energieabhängigen Exportmechanismus für Riboflavin hin. Diffusion konnte aufgrund der Ergebnisse mit Ethanol-gezogenen Zellen als Mechanismus für den Efflux ausgeschlossen werden.

2.1.2.2. Nachweis eines energieabhängigen separaten Efflux-Carrier-Systems für Riboflavin

Im Falle der Exkretion kann zum Nachweis eines Carrier-vermittelten Transports nicht ohne weiteres eine Michaelis-Menten-Analyse durchgeführt werden, da die interne Riboflavinkonzentration nicht gezielt verändert werden kann. Der postulierte Carrier-vermittelte Transport mußte daher über Inhibitorstudien mithilfe von N-Ethylmaleimid (NEM) und dem strukturell verwandten FMN nachgewiesen werden. NEM hemmt durch kovalente Modifikation von Membranproteinen (Alkylieren von Cystein-Resten) u.a. Carrier des Energiestoffwechsels (Devés und Krupka, 1981a und 1981b). Die Effekte der Zugabe von

NEM und FMN auf den Riboflavinexport wurden an Zellen im frühen Produktionsstadium vorgenommen, wo noch niedrige Exportraten vorliegen (s. Abb. 15B). Durch Zugabe des Inhibitors NEM wurde die Geschwindigkeit des Riboflavinexports deutlich vermindert (Abb. 17). Außerdem ist Abb. 17 zu entnehmen, daß die Zugabe des vom Riboflavin abgeleiteten Nukleotids FMN zu einer Steigerung der Riboflavinexkretion führt. Mithilfe von HPLC und fluorimetrischer Quantifizierung war vorher für FMN gezeigt worden, daß keine signifikante Aufnahme in die Zelle stattfindet, ein Gegen austauschmechanismus FMN-Riboflavin also ausgeschlossen werden konnte. Es wurde daher angenommen, daß die Hemmung der Wiederaufnahme von Riboflavin zu den gesteigerten apparenten Effluxraten führt. Dieser Efflux-steigernde Effekt war jedoch nur in der frühen Produktionsphase signifikant und meßbar, da im Verlaufe der Produktion eine deutliche Erhöhung der meßbaren Exportraten stattfindet (s. Abb. 15B). Die den Riboflavin-Efflux steigernde Wirkung von FMN wurde dementsprechend auf kompetitive Inhibition des Aufnahmesystems zurückgeführt. Die Ergebnisse der Inhibitorstudien weisen auf einen carriervermittelten Transport über ein separates Efflux-Carrier-System hin.

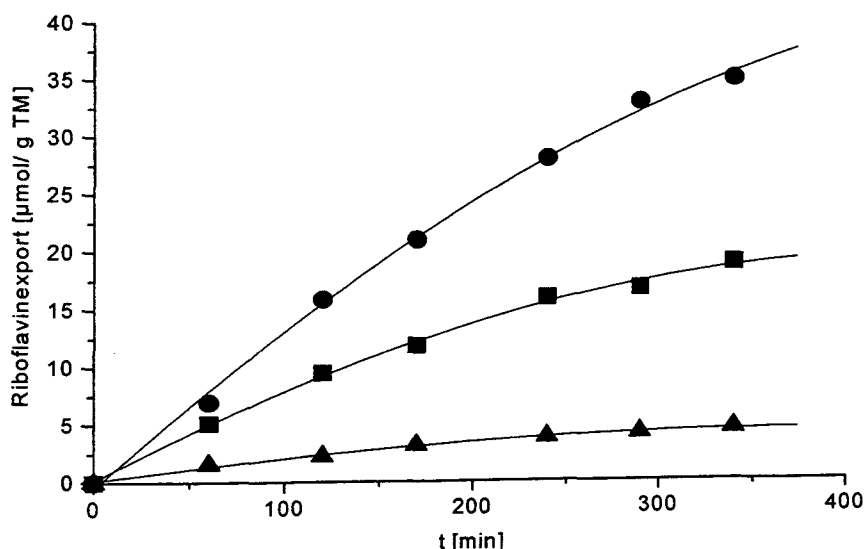


Abb. 17: Effekte der Inhibitoren FMN und NEM auf die Riboflavinexkretion nach 50 h Produktion. ■ Kontrolle ● 0,4 mM FMN ▲ 1 mM NEM

Mit Sojaöl als C-Quelle ist ATP-Synthese ausschließlich durch Elektronentransportketten-Phosphorylierung möglich. Der cytoplasmatische ATP-Gehalt Sojaöl-verstoffwechselnder Zellen sollte daher gegenüber CN^- , welches die terminale Oxidase der Elektronentransportkette inhibiert (Steens *et al.*, 1993), empfindlich sein. Der Abbau des cytosolischen ATP-Gehalts sollte weiterhin zum Abbau energieabhängig aufgebauter Membranpotentiale führen. Der Effekt von CN^- auf die Riboflavinexkretion wurde durch Effluxmessungen in Kombination mit der Bestimmung von internem Riboflavin- und ATP-Gehalt analysiert (Abb. 18).

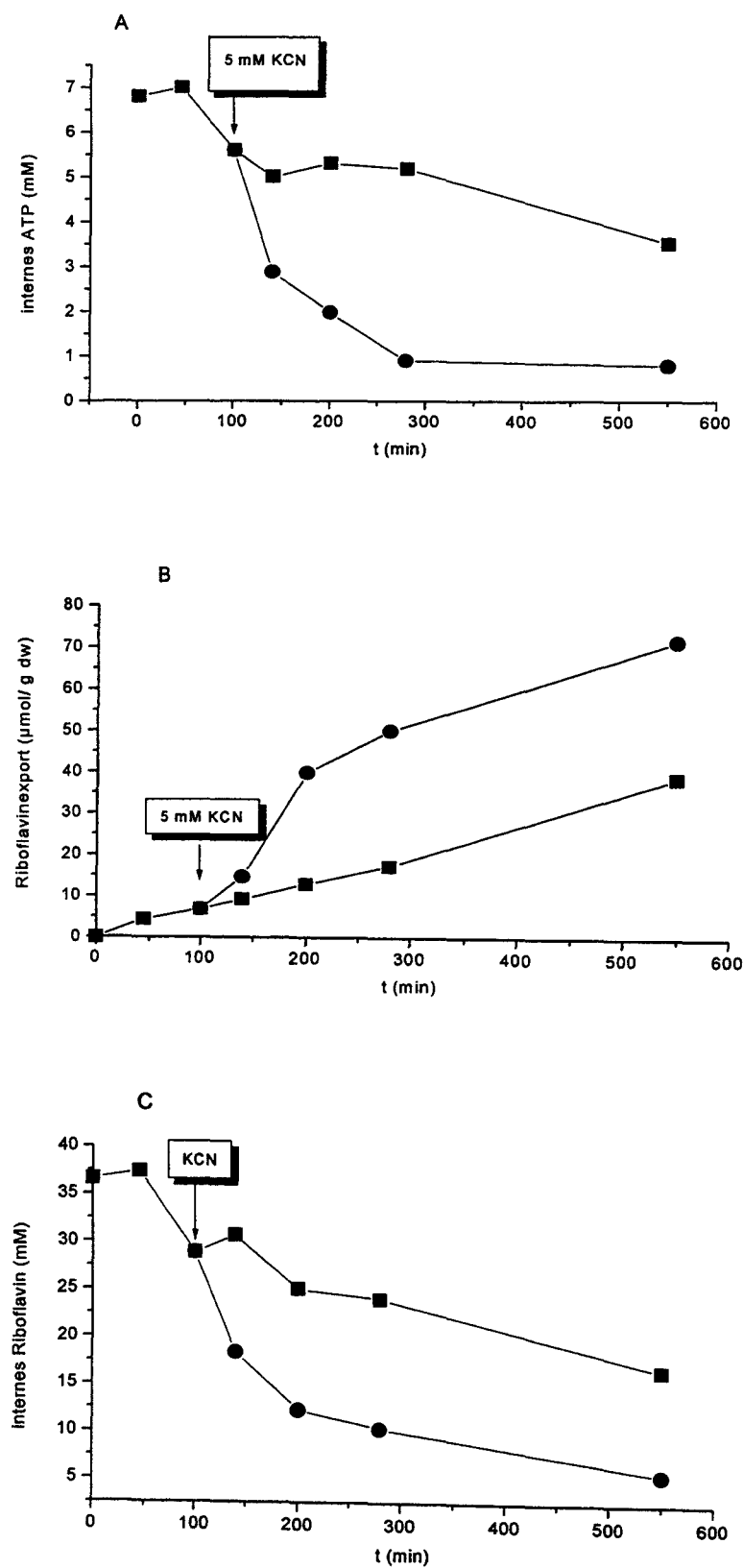


Abb. 18: Der KCN-Effekt auf (A) internen ATP-Gehalt, (B) Riboflavinexport, (C) internen Riboflavingehalt. Den Versuchsansätzen wurde zum mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt 5 mM KCN zugesetzt. ■ Kontrolle ● 5 mM KCN

Der zelltoxische Effekt wurde zunächst hinsichtlich seinen Auswirkungen auf den internen ATP-Pool analysiert. Erwartungsgemäß sank der interne ATP-Pool nach Zugabe von KCN stark ab (Abb. 18A). Die Inhibition mit CN^- erzeugte wider Erwarten gesteigerten Efflux (Abb. 18B), unter Zugabe von KCN konnte eine sofortige transiente Steigerung der Riboflavinexkretion gezeigt werden (Abb. 18B). Lichtmikroskopisch wurde sogar ein Auflösen der in der Vakuole gespeicherten Riboflavinkristalle beobachtet. KCN verursachte eine fast völlige Mobilisierung in den Vakuolen gespeichertem Riboflavin (Abb. 18C). Diese Ergebnisse ließen keine weitere Aussage zur Energieabhängigkeit des Exports zu. Möglicherweise läßt sich der Effekt dadurch erklären, daß durch die resultierende drastische Reduktion im cytoplasmatischen ATP-Pool eine Aufrechterhaltung des H^+ -Gradienten über die vakuoläre Membran in der Zelle nicht mehr möglich war. Der angenommene Zusammenbruch des H^+ -Gradienten über den Tonoplasten führte dann zum vollständigen Efflux des intravakuolär gespeicherten Produktes (Abb. 18C). Unter diesen Bedingungen wurde allerdings ein erster Hinweis darauf erhalten, daß die vakuoläre Riboflavinspeicherung keine stoffliche Einbahnstraße darstellt.

2.2. Zellbiologische Techniken als Grundlage für die Analyse der vakuolären Riboflavinspeicherung

Die Analyse der vakuolären Riboflavinspeicherung und der dazugehörigen Transportprozesse über den Tonoplasten machte das Etablieren präparativer Methoden erforderlich, die Zugang zum vakuolären Kompartiment verschafften. Es wurden deshalb zunächst Vakuolenpräparationstechniken etabliert, wobei für die unterschiedlichen Fragestellungen sowohl Organellen isoliert als auch Vakuolen *in situ* durch selektives Permeabilisieren der Plasmamembran erstellt wurden.

Für die vakuoläre Akkumulation von Riboflavin wurde Abhängigkeit von der Aktivität der vakuolären H^+ -ATPase erwartet. Es wurde daher eine Methode zur Isolierung des Enzyms erarbeitet, um die biochemischen Eigenschaften der V-ATPase von *A. gossypii* hinsichtlich Hydrolyseaktivität und Inhibitorsensitivität für Modulationen der Transportprozesse am Tonoplasten zu charakterisieren.

2.2.1 Isolierung der Vakuolen

Die Isolierung von Vakuolen erfolgte vereinfacht dargestellt über drei Aufreinigungsschritte aus Hyphenzellen von *A. gossypii*: Protoplastierung der Zellen, Lyse der Protoplasten und Abtrennung der reinen Vakuolenfraktion über einen Stufengradienten. Die Reinheit der isolierten Vakuolen wurde über Messung der cytoplasmatischen und mitochondriellen Markerenzyme Hexokinase und Fumarase in den einzelnen Fraktionen der Präparation überprüft (Tab. 12). Schon im Protoplastenlysat war nach zwei Waschschritten nur noch 25 % der ursprünglichen Hexokinase- und 18 % der anfänglichen Fumarase-Aktivität zu messen, die Vakuolenfraktion war gänzlich frei von diesen Enzymaktivitäten (Tab. 12). Als vakuolärer Marker wurde die Anreicherung der α -Mannosidase, einer Tonoplasten-ständigen Hydrolase, während der Reinigung überprüft. Tab. 12 zeigt die Verteilung von Protein, Aminosäuren und Markerenzym α -Mannosidase während der Zellfraktionierung.

Tab. 12: Aufreinigung der Vakuolen während der Zellfraktionierung aus 300-ml Kulturen

Parameter	Rohextrakt	Protoplasten	Protoplasten-Lysat	Vakuolen
Protein (mg)	450	336	70	1,75
α -Mannosidase				
U ¹ (nmol/ min)	200	183	155	24
α -Mannosidase				
(U ¹ / mg)	0,44	0,56	2,23	8,76
Hexokinase				
(U ¹ / mg)	0,26	0,41	0,06	0
Fumarase				
(mU ¹ / mg)	16,4	21,2	3,0	0
Glutamat				
(μ mol/ mg)	0,54	0,73	n.b. ²	0,49
Lysin				
(μ mol/ mg)	0,52	0,70	n.b. ²	7,1

¹U = Units

²n.b. = nicht bestimmt

Von 450 mg Gesamtprotein im Rohextrakt wurden 336 mg (75 %) im Protoplastenextrakt und 70 mg (15,5 %) im Protoplastenlysat nachgewiesen. Das über Zentrifugationsschritte gewaschene Protoplastenlysat wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt,

wobei es für den Aufreinigungseffekt entscheidend war, das Lysat mit den Gradientenlösungen zu überschichten. Nach der Zentrifugation waren nicht-lysierte Protoplasten und Zelltrümmer am Boden des Zentrifugenröhrchens pellettiert, die Hauptmenge an unlysierten Protoplasten konnte aber in der Grenzschicht zwischen Ficoll/Saccharose- und Saccharosekissen nachgewiesen werden. Vakuolen waren zwischen Saccharose und Sorbit sowie teilweise im Sorbitkissen lokalisiert (**Abb. 19**).

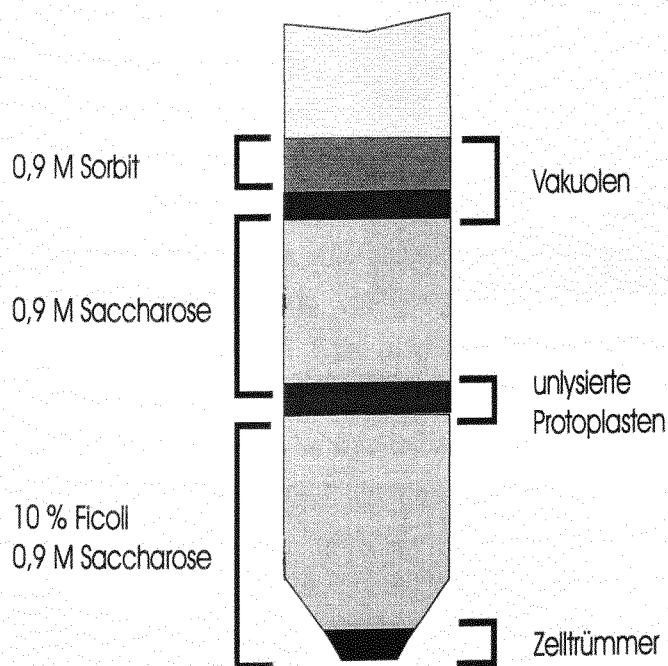
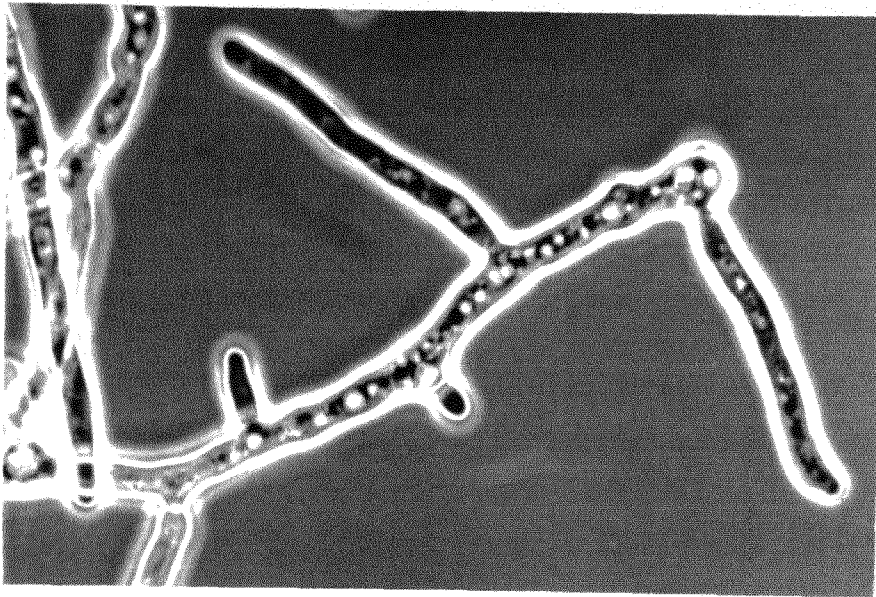


Abb.19: Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der Vakuolen aus *A. gossypii*

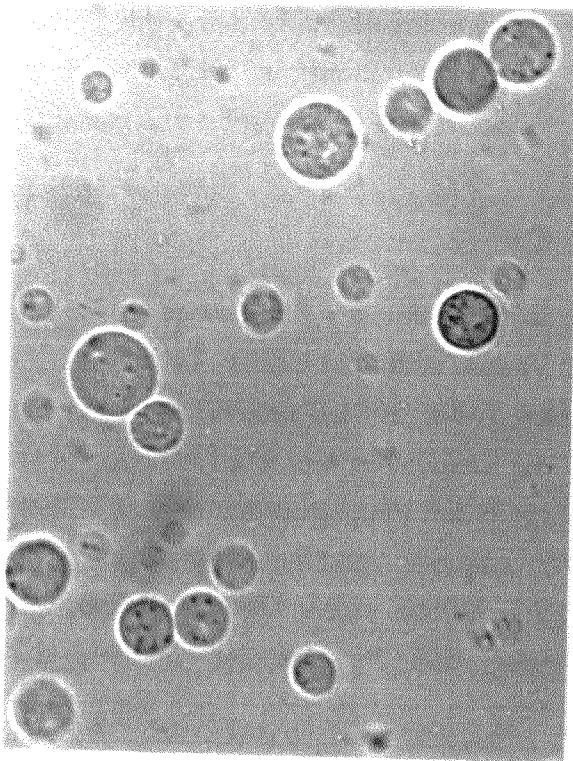
Lichtmikroskopisch konnte eine reine Fraktion intakter Vakuolen nachgewiesen werden (**Abb. 20**). In den Phasenkontrastbildern sieht man Vesikel uniformer Größe, weniger als ein intakter Protoplast wurde pro 100 Vakuolen gezählt (**Abb. 20C**). Durch Vitalfärbung mit Neutralrot (Peterson, 1979) konnte die Intaktheit der vakuolären Membran nachgewiesen werden. Das vakuoläre Leitenzym α -Mannosidase war in den Vakuolenpräparationen 20fach angereichert. Auch Akkumulation der hauptsächlich vakuolär vorkommenden Aminosäure Lysin (Messenguy *et al.* (1980); vgl. auch III.2.2.2.), welche in der Vakuolenpräparation 14fach angereichert vorlag, ist ein Nachweis dafür, daß die Vakuolen während der Aufreinigung unbeschädigt blieben (**Tab. 12**).

Die isolierten Vakuolen wurden im folgenden zur Aufreinigung der vakuolären H^+ -ATPase aus vakuolären Membranen (s. III.2.2.3.), zur Bestimmung von Enzymaktivitäten der vakuolären H^+ -ATPase in VMA1-Disruptanten (s. III.2.4.3.) sowie zum Screening nach dem vakuolären Riboflavincarrier über 2-D-Gelelektrophorese (s. III.2.5.) eingesetzt.

A



B



C

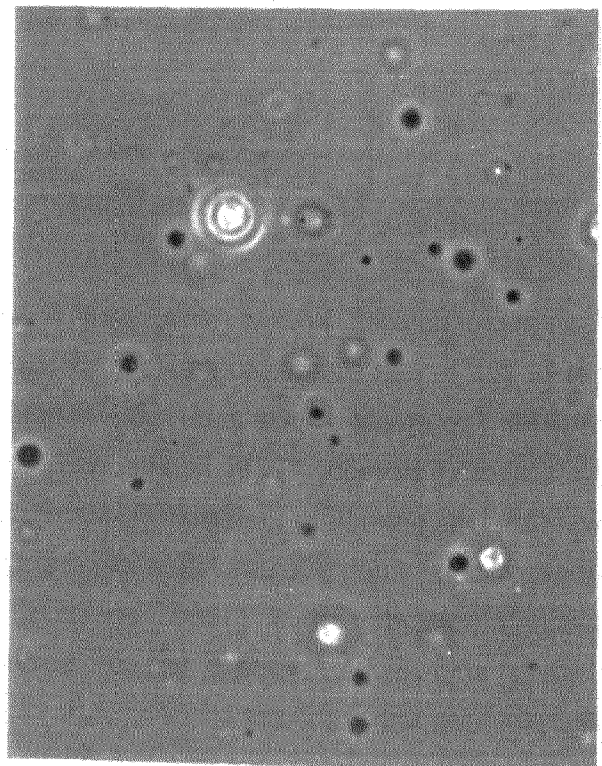


Abb. 20: Phasenkontrast-Mikroskopie der Aufreinigungsschritte während der Zellfraktionierung, **(A)** Myzel von *A. gossypii* ATCC 10895 nach 28 h Wachstum auf HA-Vollmedium **(B)** Gereinigte Protoplasten aus dem Myzel von *A. gossypii* **(C)** Gereinigte Vakuolen aus Protoplasten von *A. gossypii*, suspendiert in 0,9 M Sorbit. Der Eichstrich entspricht 20 μm .

2.2.2. Selektive Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin

Neben der Organellisolierung sollte eine weitere Methode entwickelt werden, die Zugang zur Vakuole in *A. gossypii* verschafft und die Analyse von Verteilung und Transportvorgängen von Metaboliten in der Zelle ermöglicht. Die etablierte selektive Permeabilisierung der Plasmamembran unter Instandhaltung des Tonoplasten bietet diese Möglichkeit. Es kann die Lokalisation von Metaboliten in Vakuole und Cytoplasma untersucht werden und es stehen Vakuolen *in situ* zur Verfügung, die, durch die Pilzzellwand geschützt, problemlos in Transportversuche zur Messung von Stoffflüssen über den Tonoplasten einsetzbar sind. Zur Permeabilisierung der Plasmamembran von Pilzen und Hefen sind eine Reihe von Substanzen bekannt. Dazu gehören insbesondere die Polyen-Antibiotika Nystatin und Amphotericin B (Bolard, 1986), Digitonin und Triton X-100 (Laouar *et al.*, 1992), Cu^{2+} -Ionen (Keenan und Weiss, 1997) sowie DEAE-Dextran (Huber-Wälchli und Wiemken, 1979). Für die Permeabilisierung von *A. gossypii*-Zellen hatte sich nur die Digitoninbehandlung als erfolgreich erwiesen. Eine effektive Permeabilisierung mit Nystatin, wie in der Literatur für *S. cerevisiae* beschrieben (Bolard, 1986), konnte für *S. cerevisiae* zwar reproduziert werden, zeigte im Falle von *Ashbya* jedoch keinen Effekt. Die Behandlung der Zellen mit Triton X-100 führte hingegen schon in sehr geringen Mengen (0,005 % (w/v)) zur vollständigen Zerstörung aller zellulären Membranen. Das für die Permeabilisierung der Plasmamembran von *A. gossypii* verwendete Saponin Digitonin bindet stöchiometrisch an Cholesterin und andere Steroidalkohole mit einer freien OH-Gruppe in β -Stellung und erhöht durch Porenbildung die Permeabilität der Membran. Die Permeabilisierung mit Digitonin wurde wie unter II.4.9. beschrieben durchgeführt.

Nach mehreren Versuchsreihen über breite Konzentrationsbereiche konnte zunächst lichtmikroskopisch festgestellt werden, daß bei Digitoninkonzentrationen größer als 0,01 % (w/v) die Vakuolenmembran zerstört wurde. Zur Titration der erforderlichen Digitoninmenge, die selektiv die Plasmamembran permeabilisiert, den Tonoplasten aber nicht schädigt, wurde daher der Konzentrationsbereich 0 - 0,01 % (w/v) Digitonin analysiert. Zur Kontrolle des Permeabilisierungserfolges mit Digitonin wurde das Austreten von Aminosäuren (**Abb. 21A**) und die Abnahme des intrazellulären ATP-Gehaltes (**Abb. 21B**) verfolgt. Aspartat und Glutamat wurden hierbei als cytosolische Marker, Lysin als vakuolärer Marker herangezogen (Messenguy *et al.*, 1980).

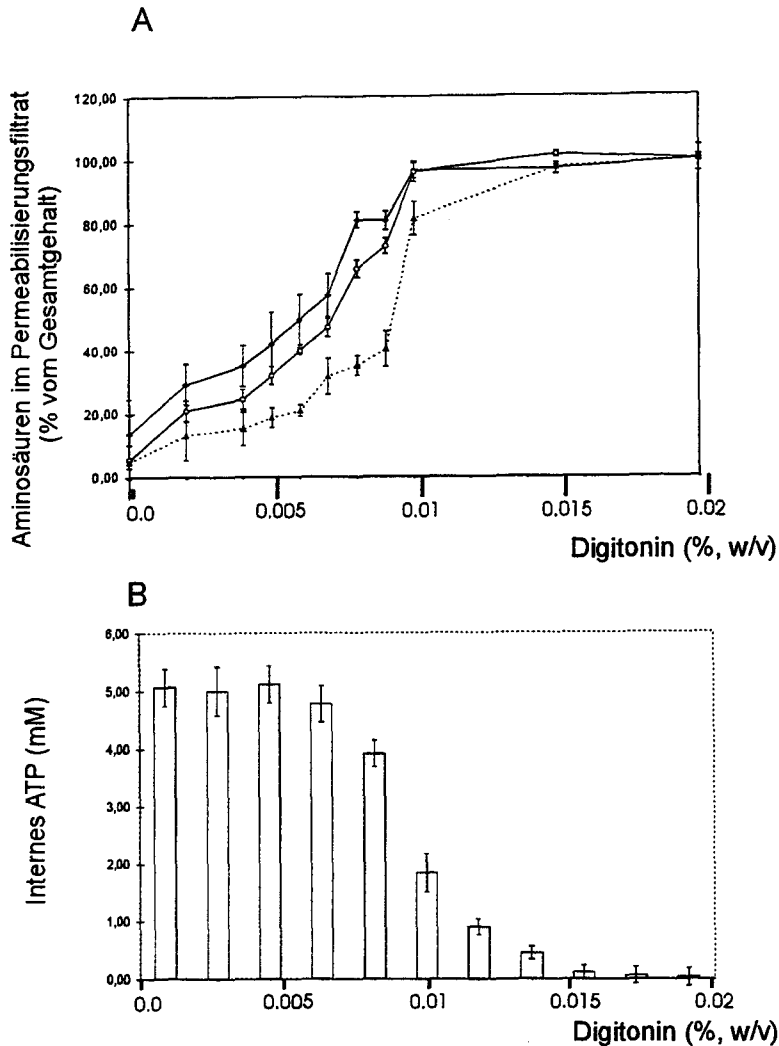


Abb. 21: Titration des Digitonin-Effektes auf die Intaktheit der Plasmamembran.

Die Konzentration der folgenden Substanzen wurde nach 10 min Digitonin-Behandlung bei 30 °C, 120 rpm analysiert: **(A)** ausgetretene Aminosäuren, Symbole: ◆ Aspartat, ○ Glutamat, ▲ Lysin **(B)** interner ATP-Gehalt der Zellen

Das Austreten der Aminosäuren zeigte eine graduell zunehmende

Perforation der Membranen von *A. gossypii* mit steigenden Digitoninmengen: cytosolische Aminosäuren im Permeabilisierungsfiltrat wurden schon bei Digitoninkonzentrationen von 0,001 % (w/v) detektiert und stiegen signifikant ab Konzentrationen über 0,005 % (w/v). Bei Digitoninkonzentrationen von 0,009 % (w/v) waren cytosolische Aminosäuren fast gänzlich ausgetreten, wohingegen der Hauptanteil des vakuolären Markers Lysin noch in der Zelle zurückgehalten wurde. Höhere Digitoninkonzentrationen führten zur vollständigen Zerstörung der vakuolären Membran.

Um den Konzentrationsbereich, der spezifisch nur die Plasmamembran permeabilisierte, genauer zu definieren, wurde die Inkubation bei 0,001 - 0,006 % (w/v) Digitonin über die Akkumulation von Acridin Orange analysiert (s. II.8.1.) (**Abb. 22**), einem Fluoreszenzfarbstoff, der in sauren Kompartimenten zurückgehalten wird (Cononico und Bird, 1969). In intakten Vakuolen liegt ein pH-Gradient über dem Tonoplasten vor, die Vakuolen sind im Vergleich zum Cytoplasma saure Kompartimente (Finbow und Harrison, 1997). Über Akkumulation von Acridin Orange konnte funktionelle Stabilität

der Vakuolen bis zu Digitoninkonzentrationen von 0,004 % (w/v) nachgewiesen werden (Abb. 22).

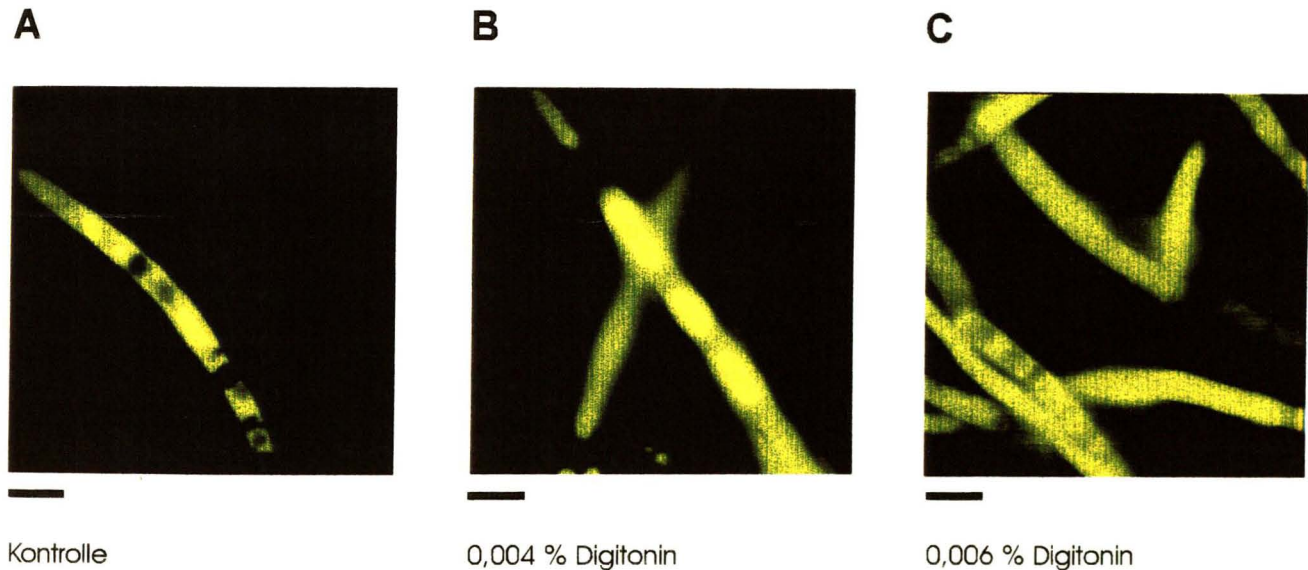


Abb. 22: (A) Acridin Orange-Färbung von *A. gossypii*-Hyphen. (B) Acridin Orange-Färbung von permeabilisierten Hyphen (0,004 % Digitonin) (C) Acridin Orange-Färbung von permeabilisierten Hyphen (0,006 % Digitonin), jeweils für 10 min, 30 °C. Der Eichstrich entspricht 20 µm.

Um die Permeabilisierungsprozedur weiter zu optimieren, wurde die Inkubationszeit zwischen 5 und 30 min variiert. Eine optimale Permeabilisierung der Plasmamembran in Gegenwart von 0,003 % (w/v) Digitonin wurde bei 10 bis 20 min Inkubation erreicht. Unter diesen Bedingungen wurde mithilfe der Acridin-Orange-Methode keine signifikante Permeabilisierung der vakuolären Membran gemessen.

Die durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran entstandenen Vakuolen *in situ* wurden im folgenden zur Analyse der vakuolären Akkumulation von Riboflavin in *A. gossypii* (s. III.2.3.1. und III.2.4.4.) sowie für Riboflavin-Transportmessungen über den Tonoplasten (s. III.2.3.2.) eingesetzt.

2.2.3. Aufreinigung der vakuolären H⁺-ATPase aus *A. gossypii*

Die vakuoläre H⁺-ATPase aus *A. gossypii* wurde zur biochemischen Charakterisierung von Hydrolyseaktivität, Inhibitor-Sensitivität gegenüber Concanamycin A (Dröse *et al.*, 1993) und zur Bestimmung ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung aus vakuolären Membranen isoliert. Es wurden Vakuolen aus stationären Zellen (30 h-Kultur) präpariert (s. III.4.8.), die Isolation der V-ATPase erfolgte mit Modifikationen wie für *S. cerevisiae* beschrieben (Uchida *et al.*, 1985). Die Reinigung wurde über ATPase-Aktivitätsbestimmung in den einzelnen Präparationsschritten (Tab. 13) sowie über ein Elutionsprofil der Gradientenfraktionen (Abb. 23) charakterisiert. Abb. 24 zeigt die Polypeptidzusammensetzung ausgewählter Fraktionen der Gradientenzentrifugation. Die Messung der ATPase-Aktivität wurde in Gegenwart von 20 µM Orthovanadat und 5 mM Natriumazid vorgenommen, um eventuell anhaftende Aktivität von P- und F-Typ-ATPasen zu hemmen.

Aus 20 g Hyphen wurden durchschnittlich 60 µg V-ATPase isoliert. Dem SDS-gelelektrophoretischen Bandenmuster entsprechend war der Proteinkomplex hochrein und bis auf die 100 kDa-Untereinheit Vph1p und die 17 kDa-Untereinheit a vollständig. Tab. 13 gibt eine Übersicht über die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte.

Tab. 13: Aufreinigung der vakuolären H⁺-ATPase von *A. gossypii* aus vakuolären Membranvesikeln

Reinigungsschritt	Protein (mg)	H ⁺ -ATPase (nmol/min)	H ⁺ -ATPase (nmol/min*mg)	Aufreinigungs- faktor
vakuoläre				
Membranvesikel	18,46	22,5	1,22	1,0
EDTA-gewaschene				
Membranen	4,50	13,1	2,91	2,4
solubilisierter				
Membranen	2,01	8,0	3,99	4,1
Hauptfraktion				
Glyzeringradient	0,61	6,2	10,11	8,29

Über die beschriebene Präparationstechnik wurde eine 8-fache Aufreinigung der eingesetzten vakuolären H⁺-ATPase-Aktivität erreicht. Die Ausbeute betrug etwa 30 % des eingesetzten Materials (Tab. 13). Die EDTA-Waschschritte stellten eine effektive Behandlung vor Solubilisierung der Membranproteine dar, da in diesem Schritte 75 % des Gesamtproteins aus den Membranen herausgewaschen wurden. Die Hauptfraktion an gereinigter V-ATPase wurde bei relativ hohen (39 %) Glycerin-Konzentrationen aufgefangen (Abb. 23).

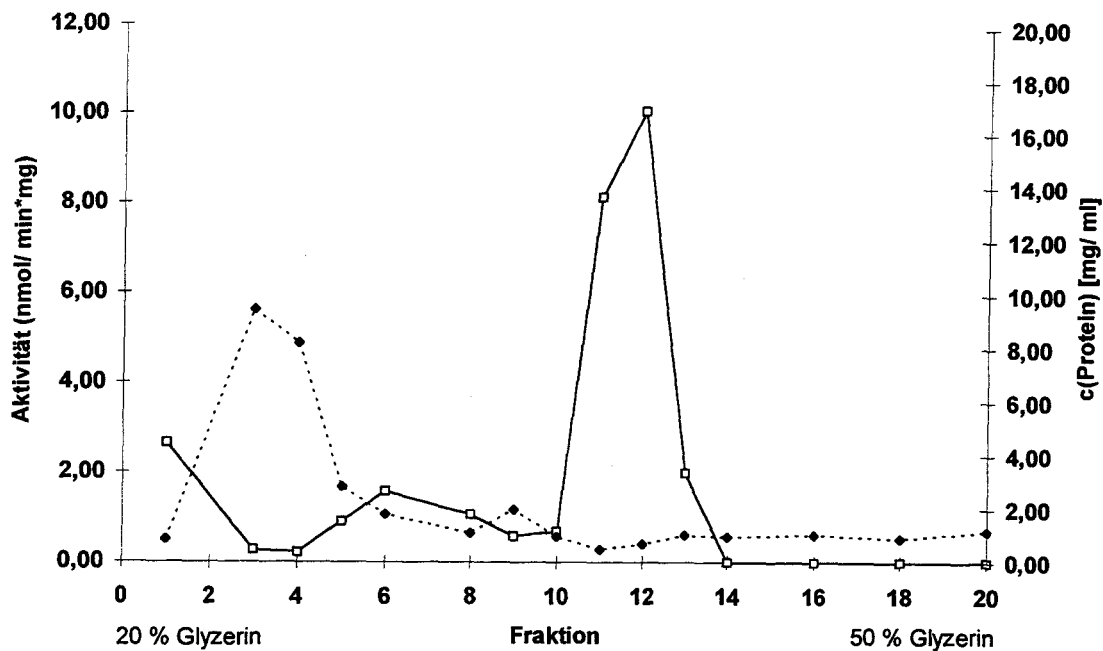


Abb. 23: Reinigung der V-ATPase aus *A. gossypii* : Elutionsprofil von Proteingehalt und Enzym-Aktivität im Glyzeringradienten. Die durchbrochene Linie stellt den Proteingehalt der Fraktionen dar, die durchgezogene Linie die ATP-Hydrolyseaktivität. Die wie unter II.5.1. beschrieben erhaltene solubilisierete V-Membranfraktion wurde auf einen Glyzeringradienten aufgetragen (300 µl Probe auf 12 ml Gradient). Die Zentrifugation wurde für 13 h bei 125.000 g durchgeführt (Beckmann, SW40i Ausschwingrotor) und die Verteilung von Protein und ATPase-Aktivität wurde in den Gradientenfraktionen bestimmt.

Die Analyse über SDS-PAGE zeigte in der Gradienten-Fraktion mit maximaler Aktivität 7 Polypeptide mit berechneten molekularen Massen von 68, 60, 50, 42, 35, 32 und 28 kDa (**Abb. 24**). Das für Protonentranslokation und Zusammenlagerung der V-ATPase essentielle 100 kDa-Polypeptid Vph1p (Manolson *et al.*, 1992b) und die 17 kDa-Untereinheit a konnten nicht über Gelelektrophorese detektiert werden. Die Größen der detektierten Proteine stimmen gut mit denen der Untereinheiten der V-ATPasen von *S. cerevisiae* (Kane *et al.*, 1989) und *N. crassa* (Bowman *et al.*, 1986) überein.

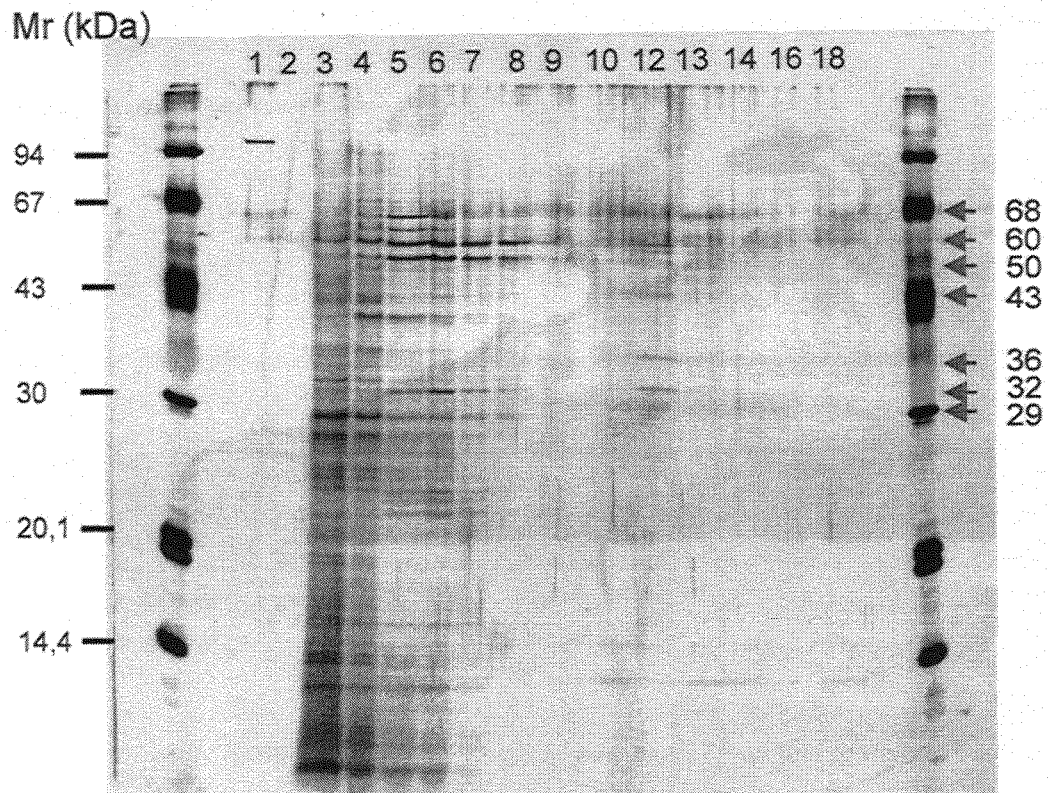


Abb. 24: SDS-PAGE der vakuolären Membranproteine nach Glycerin-Gradientenzentrifugation. Solubilisierete V-Membranvesikel wurden auf einen 20 - 50 %igen Glyzeringradienten aufgetragen und wie unter II.5.2. beschrieben fraktioniert. Gleiche Volumina aller Gradientenfraktionen wurden gegen 50 mM Tris/ HCl, pH 7,5, dialysiert und über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das 12 %ige SDS-Gel wurde silbergefärbt.

Von Dröse *et al.* (1993) wurde gezeigt, daß Concanamycin A (CCA) ein spezifischer Inhibitor von V-Typ ATPasen ist. Die aufgereinigte V-ATPase von *A. gossypii* wurde auf ihre Sensitivität gegenüber CCA getestet (**Abb. 25**).

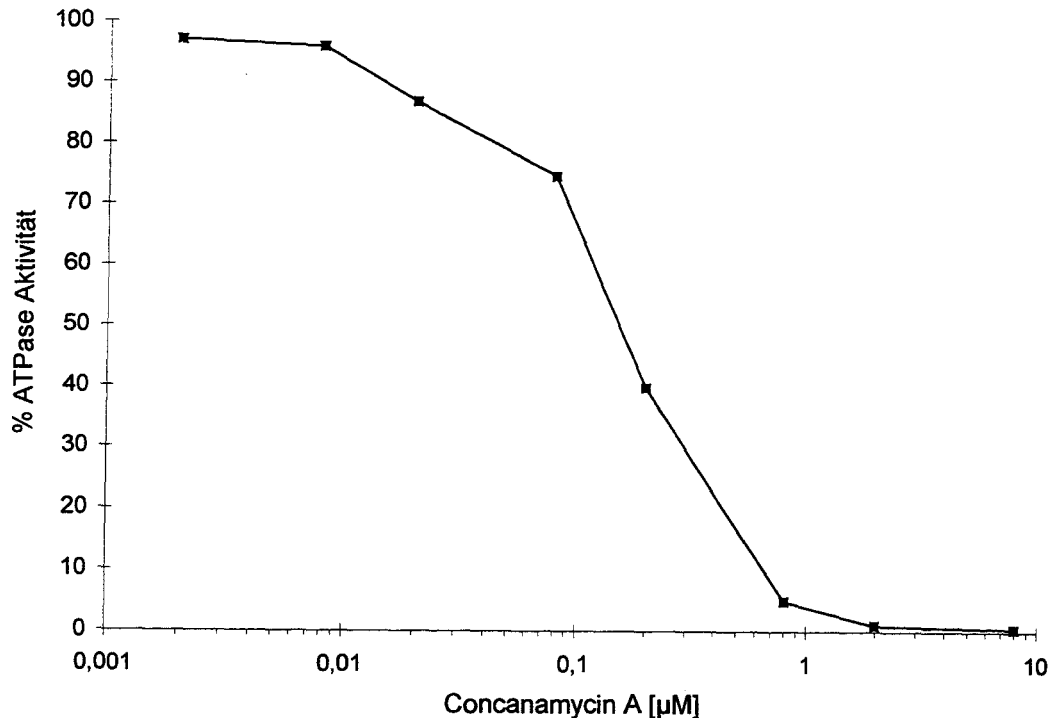


Abb. 25: CCA-Inhibition der V-ATPase von *A. gossypii*

Die halbmaximale Hemmung der V-ATPase erfolgte bei 0,1 µM CCA in einer reinen Proteinfraction. Mehr als 90 % der ATPase-Aktivität war bei 0,8 µM CCA inhibiert. Die Wirkung des V-ATPase-Hemmstoffs Concanamycin A (CCA) auf die V-ATPase von *A. gossypii* konnte damit für Inhibitionsstudien (s.III.2.3.2. und III.2.3.3.) nachgewiesen werden.

2.3. Vakuoläre Akkumulation von Riboflavin

Für die Physiologie der Pilzzelle ist die Nutzung der Vakuole als Lysosom, als abrufbares Speicherkompartiment zur Regulation cytoplasmatischer Metabolitgehalte sowie zur pH- und Ionenhomöostase des Cytoplasmas entscheidend. Im Falle der Riboflavinproduktion in *A. gossypii* ist licht- und fluoreszenzmikroskopisch schon zu Beginn der Produktionsphase gut zu erkennen, daß ein signifikanter Teil des Riboflavins in der Vakuole akkumuliert wird. Die biochemischen Grundlagen dieser Verteilung zwischen den Kompartimenten sollten aufgeklärt und nach einem Weg für die Stoff-Flußumlenkung von der Biosynthese direkt ins Produktionsmedium gesucht werden.

2.3.1. Zelluläre Lokalisation von Riboflavin in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Mithilfe der selektiven Permeabilisierungstechnik wurden die Riboflavingehalte der beiden Kompartimente Cytosol und Vakuole über die Kultivierungsdauer (Produktionsphase) quantitativ ermittelt und mit den mikroskopischen Daten verglichen. Dazu wurden die Zellen zu verschiedenen Zeiten der Produktionsphase (Sojaölkultur) zunächst mit 0,003 % (w/v) Digitonin permeabilisiert und ein Aliquot der Lösung zur Riboflavinbestimmung eingesetzt. Anschließend wurde mit einer höheren Konzentration (0,02 % (w/v) Digitonin) der Vakuolenaufschluss vorgenommen.

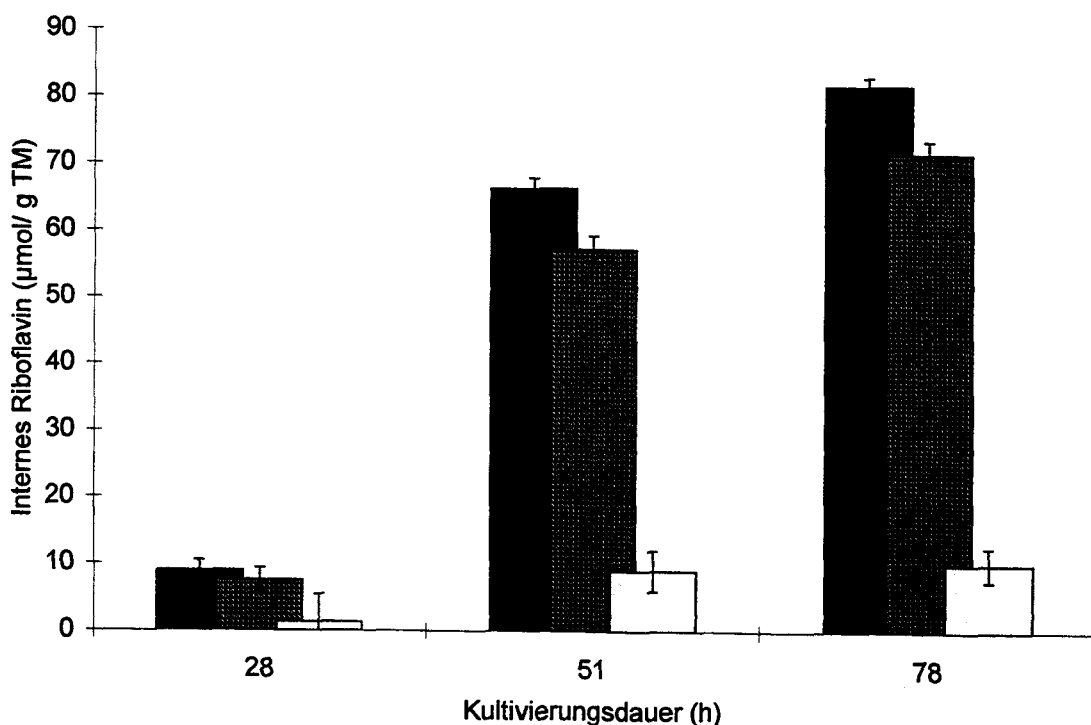


Abb. 26: Lokalisation von Riboflavin in *A. gossypii* ItaGS01 über die Kultivierungsdauer, ■ Gesamtgehalt zellintern ▨ vakuolärer Gehalt □ cytosolischer Gehalt.

Abb. 26 zeigt eine deutliche Akkumulation von Riboflavin in der Vakuole schon in der frühen Produktionsphase. Es liegt über den betrachteten Zeitraum ein nahezu konstantes Verteilungsmuster von cytosolischem Riboflavin zu vakuolärem Riboflavin von 15 % : 85 % vor, was sich gut mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen deckt (ohne Abbildung). Von der Gesamtproduktion werden etwa 50 % in der Vakuole zurückgehalten und nur ungefähr 50 % ins Medium exportiert.

2.3.2. Riboflavintransport an der Vakuolenmembran

Mithilfe permeabilisierter Hyphen (s.III.2.2.2.) sollten die für die vakuoläre Akkumulation maßgeblichen Transportprozesse am Tonoplasten charakterisiert werden. Das Quantifizieren der vakuolären und cytosolischen Riboflavinverteilung (s. III.2.3.1.) hatte auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den beiden Kompartimenten hingewiesen, wie es beispielsweise für die intrazelluläre Verteilung von Aminosäuren in filamentösen Pilzen nachgewiesen wurde (Weiss, 1973; Roos, 1997). Neben der Charakterisierung des zur Akkumulation von Riboflavin führenden Aufnahmeprozesses sollte daher die Existenz eines vakuolären Exportsystems überprüft werden.

2.3.2.1. Aufnahmemessungen an permeabilisierten Hyphen

Alle bisher beschriebenen Aufnahmeprozesse in Pilzvakuolen nutzen als Triebkraft das von der vakuolären H^+ -ATPase generierte elektrochemische Potential über den Tonoplasten (Jennings, 1995). Die Riboflavinaufnahme in die Vakuole von *A. gossypii* sollte durch einen ^{14}C -Riboflavin-Aufnahmeassay an permeabilisierten Hyphen charakterisiert werden. In einem weiterführenden Ansatz sollte mithilfe des Inhibitors CCA die Abhängigkeit der vakuolären Riboflavinaufnahme von der Aktivität der V-ATPase untersucht werden. Die inhibitorische Wirkung von CCA auf die V-ATPase von *A. gossypii* war unter III.2.2.3. nachgewiesen worden.

Es konnte keine Riboflavinaufnahme in permeabilisierte Hyphen (WT und ItaGS01) gemessen werden (Abb. 27). Um die Methode zu überprüfen, wurde zur Kontrolle die Aufnahme von ^{14}C -Lysin und ^{14}C -Arg („vakuoläre“ Aminosäuren, s. III.2.2.2.) mit permeabilisierten Zellen gemessen. Lysin-Aufnahme in die Vakuole konnte ebenfalls nicht gemessen werden. Bei der ^{14}C -Arginin-Aufnahme wurde zwar hohe Radioaktivität auf den Filtern detektiert (s. II.4.11.), jedoch unabhängig von der eingesetzten Arginin-Konzentration, was auf Adhäsion oder sonstige Artefakte schließen ließ. Die Ergebnisse der Aufnahmemessungen waren in Gegenwart und Abwesenheit von 10 mM ATP gleich, wodurch mangelnde Energieversorgung in Abwesenheit von ATP für die fehlende Aufnahmeaktivität ausgeschlossen werden konnte. Die permeabilisierten Hyphen eigneten sich daher nicht dazu, Aufnahmeprozesse in die Vakuole von *A. gossypii* zu analysieren. Es muß angenommen werden, daß aktive Transportvorgänge auf noch nicht geklärte Weise durch die Digitoninbehandlung beeinträchtigt werden.

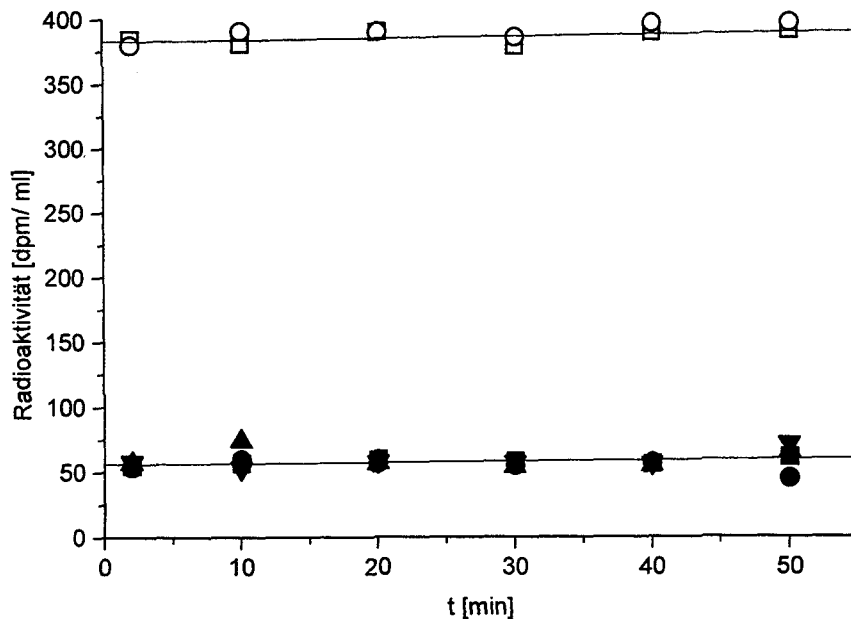


Abb. 27: Aufnahmemessungen an permeabilisierten Hyphen von ATCC 10895 in Gegenwart von 10 mM ATP, ■ 50 µM Riboflavin ● 100 µM Riboflavin ▲ 50 µM Lysin ▼ 100 µM Lysin □ 50 µM Arginin ○ 100 µM Arginin

2.3.2.2. Exportmessungen an permeabilisierten Hyphen

Exportversuche mit intakten Hyphen (s. III.2.1.2.) stellen die Überlagerung von Transportvorgängen über beide Membranen (Tonoplast, Plasmamembran) sowie von Stoffwechseleffekten dar. Mithilfe der selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran (s. III.2.2.) können reine Transportvorgänge über den Tonoplasten betrachtet werden. Durch die Permeabilisierung erfolgt ein weitgehender Abbau des intrazellulären ATP-Gehalts (s. III.2.2.). Der Abbau des elektrochemischen Protonenpotentials über die Plasmamembran ist ebenfalls wahrscheinlich, so daß in permeabilisierten Zellen die Stoffwechselvorgänge unterbrochen sind. **Abb. 28** zeigt einen Vergleich des Riboflavinexports ganzer Zellen und über die Vakuolenmembran in permeabilisierten Zellen.

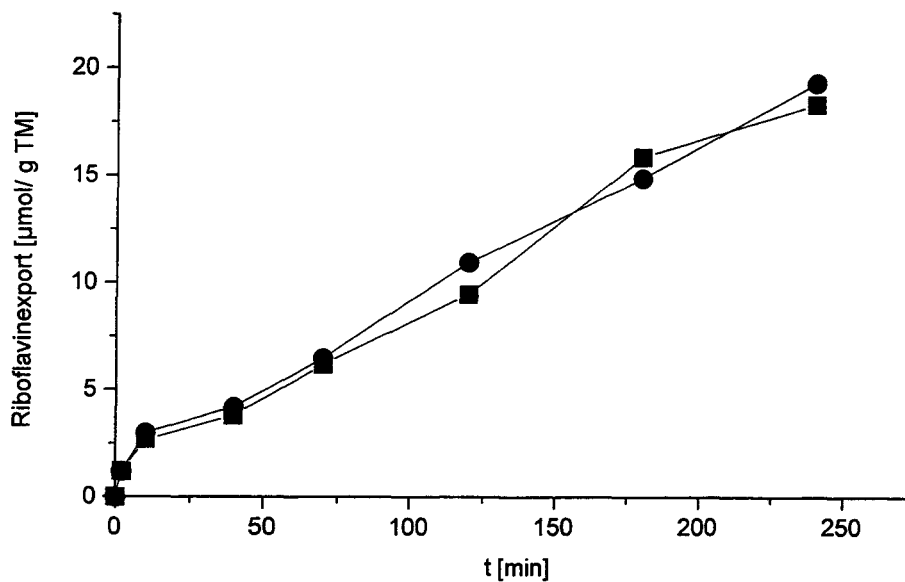


Abb. 28: Vergleich Riboflavinexport an intakten und permeabilisierten Zellen nach 50 h, ■ ItaGS01 ● ItaGS01 permeabilisiert mit 0,003 % (w/v) Digitonin

Die Exportmessungen an ganzen und mit 0,003 % (w/v) Digitonin permeabilisierten Zellen der Mutante ItaGS01 zeigten in beiden Fällen eine lineare Abhängigkeit des Riboflavinexports von der Zeit, wobei die Exportgeschwindigkeit in beiden in der mittleren Produktionsphase (50 h) bei $65 \text{ nmol/g TM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ lag. Die Exportkinetiken intakter Zellen entsprachen denen permeabilisierter Zellen. Der Riboflavinexport intakter Zellen scheint dementsprechend maßgeblich aus dem vakuolären Reservoir gespeist zu sein.

Zur Exportmessung in permeabilisierten Hyphen wurden in Anwesenheit von ATP bzw. CCA durchgeführt, um die Abhängigkeit des Riboflavinexports von externem ATP-Zusatz und von der Aktivität der V-ATPase (Inhibition mit $5 \mu\text{M}$ CCA) zu analysieren. Es sollte überprüft werden, ob Hemmung der V-ATPase zur Hemmung der Riboflavinaufnahme in die Vakuole und in der Gegenreaktion zu einem gesteigerten Export führt. **Abb. 29** zeigt den Export von permeabilisierten Zellen (50 h-Kultur) in Gegenwart und Abwesenheit von 10 mM ATP sowie nach Zusatz von $5 \mu\text{M}$ CCA.

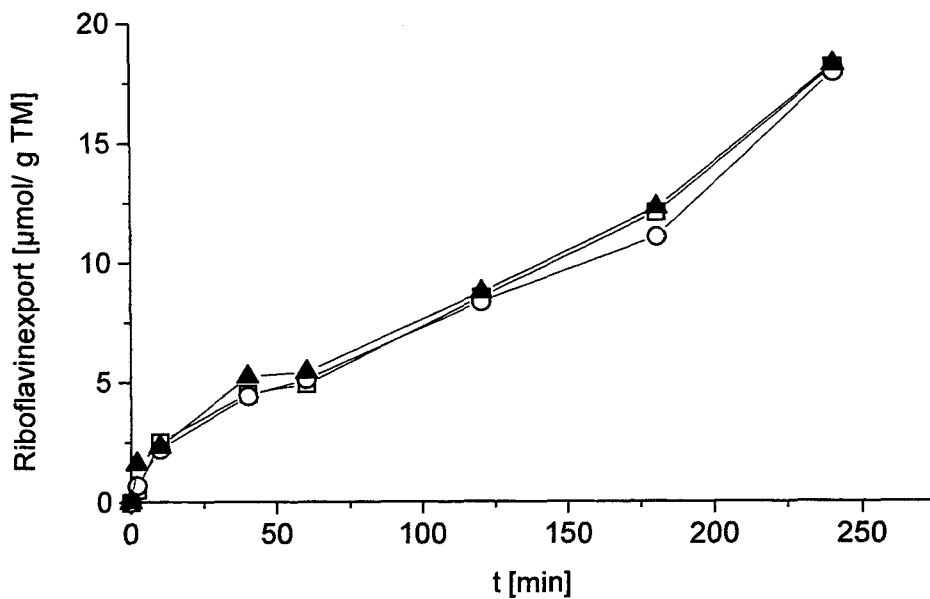


Abb. 29: Riboflavinexport aus permeabilisierten Hyphen von ItaGS01 unter Zusatz von ATP und CCA, □ Kontrolle ○ 10 mM Mg-ATP ▲ 5 μM CCA

Obwohl in permeabilisierten Zellen ein signifikanter Abbau des intrazellulären ATP-Gehalts nachgewiesen wurde (s. III.2.2.), zeigte sich in Gegenwart und Abwesenheit von 10 mM ATP kein Unterschied im Exportverhalten über den Tonoplasten. Der Efflux war nicht manipulierbar durch den ATP-Gehalt im Exportansatz. Der Export über den Tonoplasten war weiterhin unbeeinflusst vom Zusatz des Inhibitors der vakuolären ATPase Concanamycin A (CCA) (Raten: ca. $65 \text{ nmol/g TM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Eine Erhöhung des observierten Efflux durch Hemmung der Gegenreaktion, der Wiederaufnahme in die Vakuole, konnte entgegen den Erwartungen nicht detektiert werden. Die Ergebnisse der Exportversuche könnten zusammen mit fluoreszenzmikroskopischen Daten zur Riboflavin-Akkumulation in die Vakuole im frühen Produktionsstadium auf die Existenz eines einzigen reversiblen Aufnahme-/ Exportsystems in der vakuolären Membran hinweisen. Es wäre dann anzunehmen, daß dieses Transportsystem abhängig von der Produktionsphase den Riboflavintransport in bzw. aus der Vakuole hinaus katalysiert.

2.3.3. Nachweis der Abhängigkeit der vakuolären Riboflavinspeicherung von der Aktivität der V-ATPase durch Produktionsversuche

Da der Aufnahmeprozess nicht direkt zu analysieren war (vgl. 2.3.2.1.), mußte ein Umweg gewählt werden: es wurde die Produktion und Lokalisation von Riboflavin in Wachstumsmedien mit und ohne Zusatz von Concanamycin A (CCA) untersucht, um zu

klären, ob die Riboflavinaufnahme in die Vakuole ein von der Aktivität der V-ATPase abhängiger Transportprozess ist.

Zunächst wurde anhand von Wachstumsversuchen geklärt, ob eine Hemmung der V-ATPase letal für die Zellen ist. In den Wachstumsversuchen wurde CCA den Medien z.T. wiederholt zugesetzt, da die Stabilität der Substanz CCA in Flüssigkultur unbekannt war.

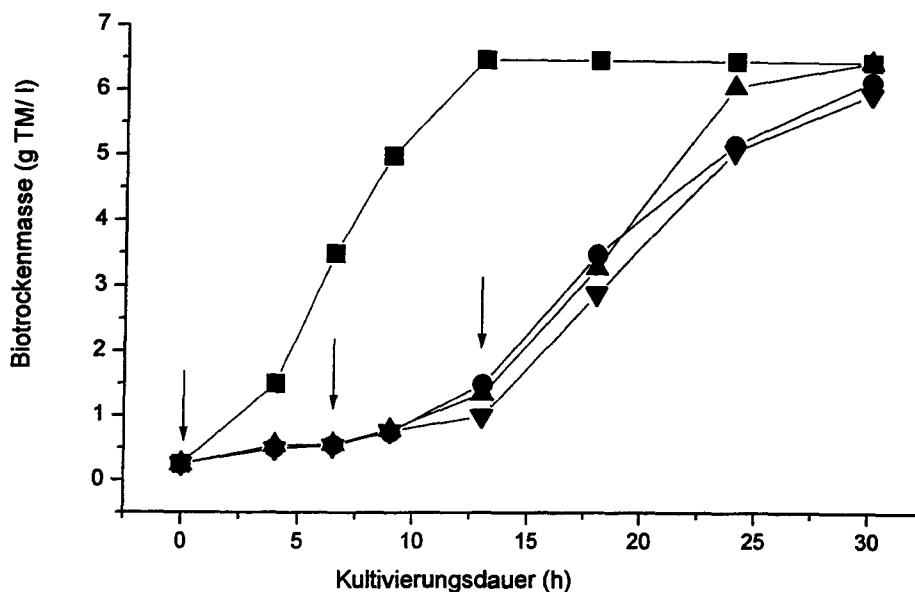


Abb. 30: Wachstum von *A. gossypii* WT unter Zusatz von 5 µM CCA. Die Zellen wurden mit Hilfe einer frischen Vorkultur auf MA2-Vollmedium \pm 5 µM CCA beimpft. ■ Kontrolle ▼ 5 µM CCA bei $t = 0$ h zugesetzt ▲ 5 µM CCA bei $t = 0$ h und 6 h zugesetzt ● 5 µM CCA bei $t = 0$ h, 6 h und 13 h zugesetzt. Die CCA-Zugabe ist im Diagramm durch die Pfeile schematisiert.

A. gossypii ist in der Lage, trotz Zusatz des V-ATPase-Inhibitors CCA anzuwachsen (Abb. 30). Im stationären Zustand wurde dieselbe Biotrockenmasse-Ausbeute verzeichnet. Die Wachstumsparameter spiegeln die durch den Inhibitor ausgelöste Verzögerung des Wachstums wieder: die Lag-Phase zu Beginn des Wachstums war von 4 auf 8 h verdoppelt, die Wachstumsrate betrug nur 66 % des Kontrollwertes. CCA war in Lösung offensichtlich stabil, die Häufigkeit des Zusatzes war für den Inhibitionseffekt auf das Wachstum ohne Belang.

Mithilfe der selektiven Permeabilisierung (vgl. III.2.2.) wurden Produktion und vakuoläre Akkumulation von Riboflavin in der Mutante ItaGS01 nach Wachstum mit und ohne Zusatz von CCA (5 µM) analysiert. Die CCA-Behandlung begann wie bei den Wachstumsversuchen mit der Anzucht der Zellen. Nach 24 h, 43 h und 67 h wurden die cytosolischen und vakuolären Riboflavingehalte sowie die ins Medium sezernierte Riboflavinsmenge bestimmt.

Abb. 31 zeigt paradigmatisch die Verteilung von Riboflavin zwischen Cytosol und Vakuole nach 67 h im Produktionsversuch.

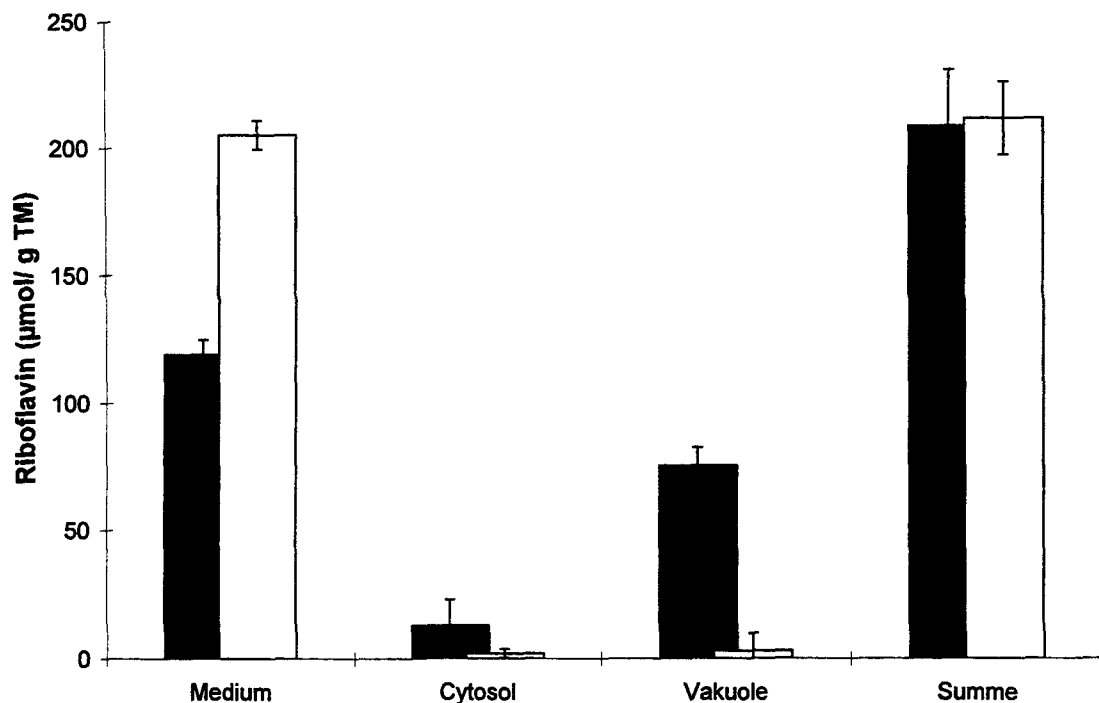


Abb. 31: Produktion und Verteilung von Riboflavin \pm 5 μ M CCA, ■ Kontrolle
□ 5 μ M CCA

Dem Diagramm ist zu entnehmen, daß die Zellen der Mutante ItaGS01 in Gegenwart des V-ATPase-Inhibitors CCA in ihren Vakuolen kein Riboflavin mehr speichern. Durch Hemmung der V-ATPase konnte eine Umlenkung der Riboflavin-Flüsse erzielt werden, die Gesamtproduktion war bei Kontrolle und CCA-Ansätzen gleich hoch, unter CCA-Zusatz wurde jedoch die sonst intravakuolär gespeicherte Riboflavinmenge ins Medium sezerniert. Der vakuolären Riboflavinakkumulation liegt den erhaltenen Daten zufolge ein energieabhängiger Aufnahmeprozess zugrunde, der von dem durch die V-ATPase generierten elektrochemischen H^+ -Potential abhängt.

2.4. Disruption des *VMA1*-Gens von *A. gossypii* und resultierende Stoff-Flußumlenkung von Riboflavin

Die mithilfe des Inhibitors CCA erzielte Riboflavinfluss-Umlenkung sollte molekularbiologisch durch Konstruktion neuer Stämme mit dysfunktionaler V-ATPase umgesetzt werden. Es wurde hierfür das für die katalytische Untereinheit A der V-ATPase-kodierende Gen kloniert und disruptiert. Die katalytische Untereinheit A wird durch das *VMA1*-Gen kodiert (vacuolar membrane ATPase 1).

2.4.1. Klonierung und Sequenzierung

Die A-Untereinheiten der bislang bekannten V-ATPasen (Vma1-Proteine) zeichnen sich durch hochkonservierte Sequenzen aus. Durch Erstellen von degenerierten Oligonukleotid-Primern aus geeigneten Abschnitten im Proteinalignment (Abb. 32) wurde über PCR ein Fragment des AgVMA1-Gens amplifiziert. Zur Kontrolle wurde mithilfe von homologen Primern das entsprechende Fragment aus *S. cerevisiae* Matrizen-DNA amplifiziert. Kontrolle und *A. gossypii*-PCR-Fragment wiesen die erwartete Größe von 585 bp auf.

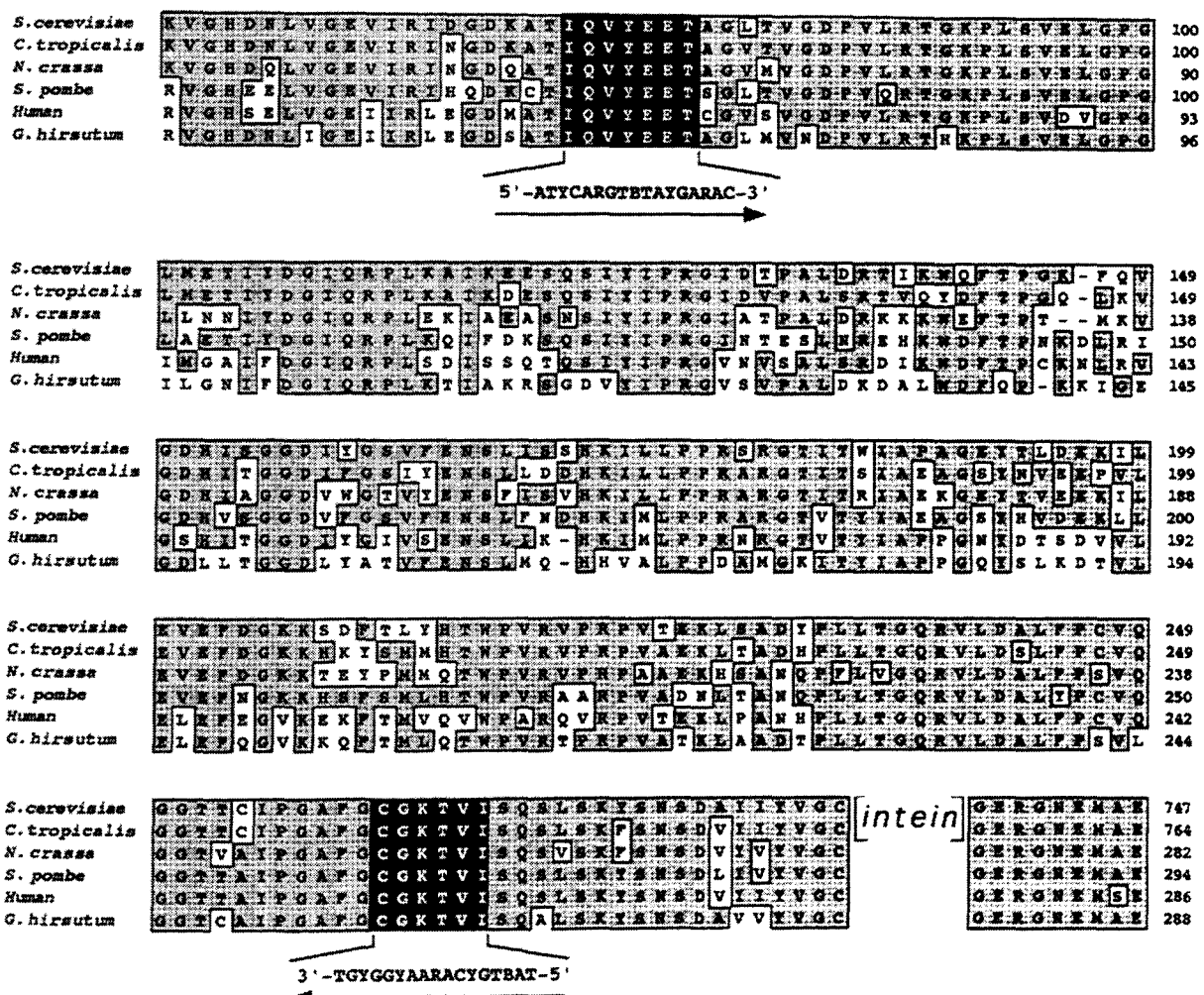


Abb. 32: Partieller Sequenzvergleich von Vma1-Proteinen verschiedenen Ursprungs sowie Lage und Sequenz der eingesetzten Oligonukleotidprimer. Die mit [intein] bezeichnete Proteinsequenz wird posttranslational herausgespalten und ist im reifen Protein nicht mehr nachzuweisen.

Das amplifizierte PCR-Fragment wurde genutzt, um eine Cosmid-Genbibliothek (cosmid vector SuperCos1, Stratagene) von *A. gossypii* (J. Revuelta, Salamanca) auf das AgVMA1-Gen abzusuchen. Um positive Cosmid-Klone zu identifizieren, die homologe Regionen von

III. ERGEBNISSE

DNA enthielten, wurde das in pJR1685 enthaltene PCR-Fragment mit [α - 32 P]dCTP mithilfe von T7-Polymerase radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Beim Hybridisieren mit der Sonde konnten 4 unabhängige Klone mit überlappenden Inserts erhalten werden. Die DNA dieser Klone wurde mit *Bam*HI verdaut und einer weiteren Southern-Blot-Analyse unterworfen, wobei das [α - 32 P]-markierte PCR-Fragment wiederum als Sonde eingesetzt wurde. Zwei positive Fragmente von 1 kb und 7 kb mit überlappenden Inserts wurden isoliert. Es wurde eine Restriktionskarte des klonierten Genabschnittes erstellt und der isolierte Genbereich für die Sequenzierung in den Plasmid-Vektor Bluescript, Stratagene, subkloniert (Abb. 33).

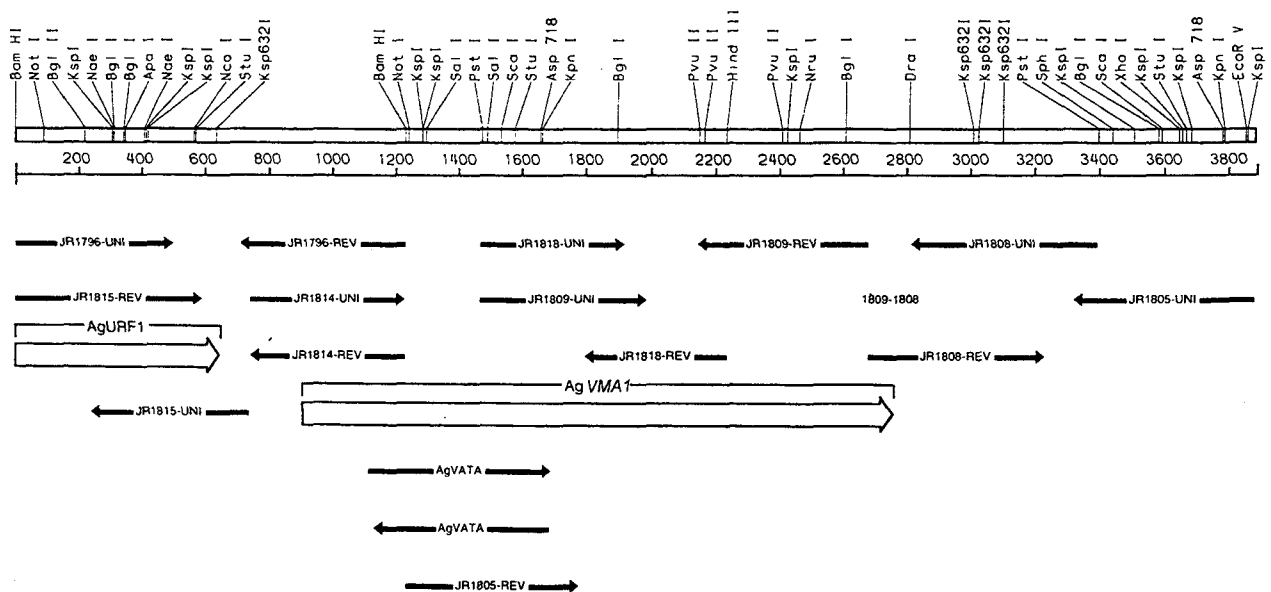


Abb. 33: Restriktionsanalyse und Lokalisation des putativen Gens *AgVMA1*. Offene Pfeile mit Gen-Bezeichnungen stellen Richtung und Größe der codierenden ORF's dar, die auf den positiven *Bam*HI-Fragmenten identifiziert wurden. Schwarze Pfeile kennzeichnen die einzelnen Sequenzierungsschritte durch Subklonieren. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Die Sequenzierung zeigte das Vorhandensein von 2 offenen Leserastern (ORF) auf den isolierten *Bam*HI-Fragmenten (Abb. 33). Über Sequenzanalyse wurde festgestellt, daß es sich zum Teil um einen URF (unidentified open reading frame), ähnlich zu YDL186W, einem URF der Hefe, handelte. Stromabwärts des 3'-Endes dieses Gens wurde ein weiteres offenes Leseraster von 1853 bp lokalisiert, das für ein putatives Polypeptid von 617 Aminosäuren mit einer berechneten Molekularmasse von 67 - 68 kDa kodiert. Nukleotid- und abgeleitete Proteinsequenz des 1853 bp-ORF sind in Abb. 34 wiedergegeben.

2521 GAGACGCATGC *SphI*

Abb. 34: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des AgVMA1 Gens. In der den ORF flankierenden 5'-Region ist das TATA-Element des Promotors unterstrichen und potentielle Transkriptions-Initiationsstellen sind durch offene Kreise (TCG/AA-Motiv) oder geschlossene Kreise (RRYRR-Motiv) symbolisiert. In der den ORF flankierenden 3'-Region sind Sequenzmotive, die dem Transkriptions-Terminations-Konsensus von Pilzen und Hefen entsprechen, durch geschlossene Kreise gekennzeichnet. Das konservierte ATP/ GTP-Bindemotiv (Uchida *et al.*, 1988) ist eingerahmt. Protein- und Nukleotid-Sequenz von AgVma1p/ AgVMA1 sind unter der Accession-Nummer AJ009881 in der EMBL-Datenbank zu erhalten.

Die computergestützte Sequenzanalyse des ORF zeigte, daß die Promotorregion als Polymerase-Bindestelle nicht das Konsensus-TATAA-Motiv enthält, sondern bei Position -237 eine Kopie der funktionellen Variante TATATA identifiziert werden konnte. Zwischen diesem TATA-ähnlichen Element und dem voraussichtlichen Translationsstart konnten weiterhin die Konsensusmotive TC(G/A)A oder RRYRR nachgewiesen werden. Diese Konsensusmotive machen 55 % aller bekannten Hefe-Transkriptions-Initiations-Stellen aus (Hanh *et al.*, 1985). In Pilzgenen geht dem Translationsstart ATG gewöhnlich eine AC-reiche Region mit einem abschließenden GC-Motiv voraus (Gurr *et al.*, 1987). Der putative Translationsstart des AgVMA1-Gens enthält ebenfalls einen solchen Sequenzabschnitt. In der nicht-kodierenden 3'-Region des ORF wurden Motive nachgewiesen, deren Funktion für das Beenden des Transkriptionsvorgangs, beispielsweise für das Prozessieren oder die Polyadenylierung des 3'-Endes der mRNA aus Genen *S. cerevisiae* bekannt sind (Russo, 1995). Dazu gehören beispielsweise zwei Kopien des Hexanukleotids TACATA und eine Kopie des Hexanukleotids TATATA, die 6 bp, 18 bp und 81 bp nach dem Stopkodon detektiert wurden.

Die abgeleitete Proteinsequenz des putativen AgVMA1-Gens zeigte, daß es für ein saures Protein (pI 5,21) von 617 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 67,8 kDa kodiert. Ein ATP-Bindemotiv (P-Loop) ([AG]-x(4)-G-K-[ST]) konnte in der Position 257 bis 264 im abgeleiteten AgVma1-Polypeptid detektiert werden (**Abb. 33**). Zwei Cystein-Reste (Cys²⁸⁴ and Cys⁵³⁹), ein Tyrosin-Rest (Tyr³⁴³) sowie ein Glycin-Rest (Gly²⁵⁰), die in allen bekannten A-Untereinheiten konserviert sind und eine wichtige Funktion für korrekte Faltung und Stabilität der A-Untereinheit haben, sind auch im *A. gossypii* Vma1p Protein präsent (Liu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997). Weiterhin sind die im katalytischen Zentrum bekannter A-Untereinheiten lokalisierten essentiellen aromatischen Reste, Phe⁴⁵², Tyr⁵³² und Phe⁵³⁸, genauso wie der saure Glu²⁸⁶-Rest, von dem Beteiligung an der ATP-Hydrolyse angenommen wird, auch in der abgeleiteten Proteinsequenz konserviert (Liu *et al.*, 1997; MacLeod *et al.*, 1998).

Das Protein-Alignment des putativen AgVma1-Proteins mit den Vma1-Proteinen von *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Neurospora crassa* und *Schizosaccharomyces pombe* zeigt 89 % Identität zu ScVma1p, 87 % zu CtVma1p, 68 % Identität zu NcVma1p und 66 % zu SpVma1p über einen Bereich von etwa 600 Aminosäuren, wovon ein partielles Alignment in **Abb. 35A** wiedergegeben ist. Eine Intein-Sequenz, wie sie *C. tropicalis* (Gu *et al.*, 1993) und *S. cerevisiae* (Chong *et al.*, 1996) aufweisen, tritt in AgVma1p nicht auf.

35A

<i>A. gossypii</i>	KVGH ^H NLVGEVIRL ^L DGD ^K ATI ^I QV ^E ETAG ^V T ^T VGD ^P VL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	100
<i>S. cerevisiae</i>	KVGH ^H NLVGEVIRI ^I DGD ^K ATI ^I QV ^E ETAG ^L T ^T VGD ^P VL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	100
<i>C. tropicalis</i>	KVGH ^H NLVGEVIRI ^I DGD ^K ATI ^I QV ^E ETAG ^V T ^T VGD ^P VL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	100
<i>N. crassa</i>	KVGH ^H NLVGEVIRI ^I DGD ^K ATI ^I QV ^E ETAG ^M T ^T VGD ^P VL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	90
<i>S. pombe</i>	RVGH ^E ELVGEVIRI ^H QD ^K CTI ^I QV ^E ETAG ^L T ^T VGD ^P VL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	100
Human	RVGH ^S ELVGEI ^I RL ^E GD ^M ATI ^I QV ^E ETAG ^C G ^V SVGD ^P VL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	93
<i>G. hirsutum</i>	RVGH ^D NLIG ^E IL ^R LE ^G D ^S ATI ^I QV ^E ETAG ^L M ^V N ^D PVL ^R TG ^K PL ^S VEL ^O PG	96

<i>A. gossypii</i>	LMETI ^I YDGI ^I QRPL ^K AIKE ^S QS ^I YIPRG ^V DA ^P AL ^S EV ^K AK ^K PG ^K - ^L GV	149
<i>S. cerevisiae</i>	LMETI ^I YDGI ^I QRPL ^K AIKE ^S QS ^I YIPRG ^I DT ^P AL ^S DR ^T I ^K N ^Q FT ^P PG ^K - ^F QV	149
<i>C. tropicalis</i>	LMETI ^I YDGI ^I QRPL ^K AIKE ^S QS ^I YIPRG ^I DT ^P AL ^S DR ^T I ^K N ^Q FT ^P PG ^K - ^F QV	149
<i>N. crassa</i>	LLNNI ^I YDGI ^I QRPL ^K AIKE ^S QS ^I YIPRG ^I AT ^P AL ^S DR ^T I ^K N ^Q FT ^P PG ^K - ^F QV	138
<i>S. pombe</i>	LAETI ^I YDGI ^I QRPL ^K AIKE ^S QS ^I YIPRG ^I NT ^E SL ^N EH ^K ND ^T FT ^P PG ^K - ^F QV	150
Human	I ^M GAI ^I FDGI ^I QRPL ^S DIS ^S Q ^T QS ^I YIPRG ^V N ^V SAL ^S DR ^T I ^K N ^Q FT ^P PG ^K - ^F QV	143
<i>G. hirsutum</i>	ILGNI ^I FDGI ^I QRPL ^K AIKE ^S QS ^I YIPRG ^V N ^V SAL ^S DR ^T I ^K N ^Q FT ^P PG ^K - ^F QV	145

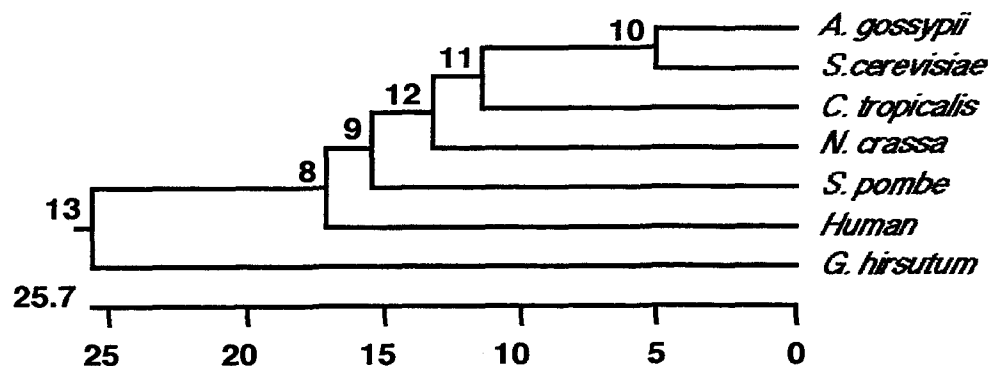
<i>A. gossypii</i>	GDHIS ^G GDI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	199
<i>S. cerevisiae</i>	GDHIS ^G GDI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	199
<i>C. tropicalis</i>	GDHIT ^G GDI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	199
<i>N. crassa</i>	GDHIA ^G GDI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	188
<i>S. pombe</i>	GDH ^V SG ^G DI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	200
Human	GS ^H IT ^G GDI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	192
<i>G. hirsutum</i>	GD ^L LT ^G GDI ^I GF ^E VFN ^E LL ^S EDHKILL ^P PRARG ^T IT ^W IA ^P AG ^E IT ^V DE ^T VL	194

<i>A. gossypii</i>	EVEFD ^G GKK ^I YS ^I YS ^M FHN ^P VR ^V PR ^V VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	249
<i>S. cerevisiae</i>	EVEFD ^G GKK ^I YS ^I YS ^M FHN ^P VR ^V PR ^V VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	249
<i>C. tropicalis</i>	EVEFD ^G GKK ^I YS ^I YS ^M FHN ^P VR ^V PR ^V VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	249
<i>N. crassa</i>	EVEFD ^G GKK ^I YS ^I YS ^M FHN ^P VR ^V PR ^V VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	238
<i>S. pombe</i>	EVEFD ^G GKK ^I YS ^I YS ^M FHN ^P VR ^V PR ^V VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	250
Human	EL ^E FE ^G V ^K E ^K FT ^M VQ ^V PA ^L QV ^R VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	242
<i>G. hirsutum</i>	EL ^E FE ^G V ^K E ^K FT ^M VQ ^V PA ^L QV ^R VT ^T EKL ^S AD ^I PL ^L TG ^Q RVLD ^A LP ^C VO	244

<i>A. gossypii</i>	GGT ^T C ^I PGAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	293
<i>S. cerevisiae</i>	GGT ^T C ^I PGAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	747
<i>C. tropicalis</i>	GGT ^T C ^I PGAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	764
<i>N. crassa</i>	GGT ^T V ^A IPGAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	282
<i>S. pombe</i>	GGT ^T AI ^P GAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	294
Human	GGT ^T AI ^P GAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	286
<i>G. hirsutum</i>	GGT ^T CA ^I PGAF ^G CGK ^T VI ^S QSL ^S KYS ^N SD ^A II ^V YG ^C	288

Abb. 35: (A) Partielles Proteinalignment der Vma1-Proteine verschiedener Organismen. Die mit [intein] bezeichnete Proteinsequenz wird posttranslational herausgespalten und ist im reifen Protein nicht mehr nachzuweisen.

35B



(B) Dendrogramm bekannter Vma1-Proteine. Der phylogenetische Stammbaum der von bekannten *VMA1*-Genen abgeleiteten Proteinsequenzen wurde über CLUSTAL W Analyse (Higgins *et al.*, 1992) aufgestellt. Die Zahlen auf der Maßstabsskala und den Verzweigungen repräsentieren den Prozentsatz an Aminosäuresubstitutionen.

Mithilfe des Programmes CLUSTAL W Analyse (Higgins *et al.*, 1992) wurden die phylogenetischen Abstände bekannter Vma1 Proteine zu AgVma1p berechnet. Das Programm führt zunächst einen Vergleich der vorgegebenen Sequenzen durch und berechnet nach den relativen Entfernungen der Sequenzen die phylogenetischen Abstände über den Prozentsatz an Aminosäuresubstitutionen (Abb. 35B). Der phylogenetische Stammbaum hat sich in die Proteinfamilien von Pflanzen, Tieren und Pilzen/ Hefen verzweigt. Wie der Stammbaum verdeutlicht, sind die Proteine AgVma1p und ScVma1p sehr nah miteinander verwandt, während AgVma1p und NcVma1p phylogenetisch weiter entfernt sind. Auch die Ähnlichkeit zwischen den beiden Hefeproteinen CtVma1p und ScVma1p ist geringer. Mit AgVma1p wurde damit das - nach bisherigem Kenntnisstand - ähnlichste Vma1-Protein zum entsprechenden *Saccharomyces*-Protein gefunden.

2.4.2. Disruption des *VMA1*-Gens

Vor Durchführung der Disruption wurde die Anzahl der genomischen Kopien des AgVMA1-Gens überprüft, um für die Disruption eine funktionelle Substitution ausschließen zu können. Hierfür wurde genomische DNA der drei Stämme ATCC10895 (WT), ItaGS01 und A27 präpariert und mit *Bam*HI, *Pst*I und *Sac*II geschnitten. Die Sequenz von AgVMA1 beinhaltet jeweils eine Schnittstelle für diese Restriktionsenzyme. Die Fragmente wurden

gelelektrophoretisch aufgetrennt und über Southern Blot analysiert. Die Hybridisierung mit der [α - 32 P]-markierten Sonde erfolgte mit abgestufter Stringenz: 65 °C/ 1% SDS, 55 °C und 45 °C. Southern-Hybridisierung unter verschiedenen Stringenzbedingungen zeigte in allen Fällen dieselben Fragmente der erwarteten Größe (Abb. 36). Durch gleiche Bandenmuster nach Restriktionsanalyse und Southernhybridisierung unter drei abgestuften Stringenzbedingungen wurde die Existenz von nur einer genomischen Kopie des *VMA1*-Gens nachgewiesen. Das Ergebnis war weiterhin für alle 3 Stämme identisch und ist kohärent mit dem Vorkommen eines *VMA1*-single-copy-Gens in der Hefe *Saccharomyces*.

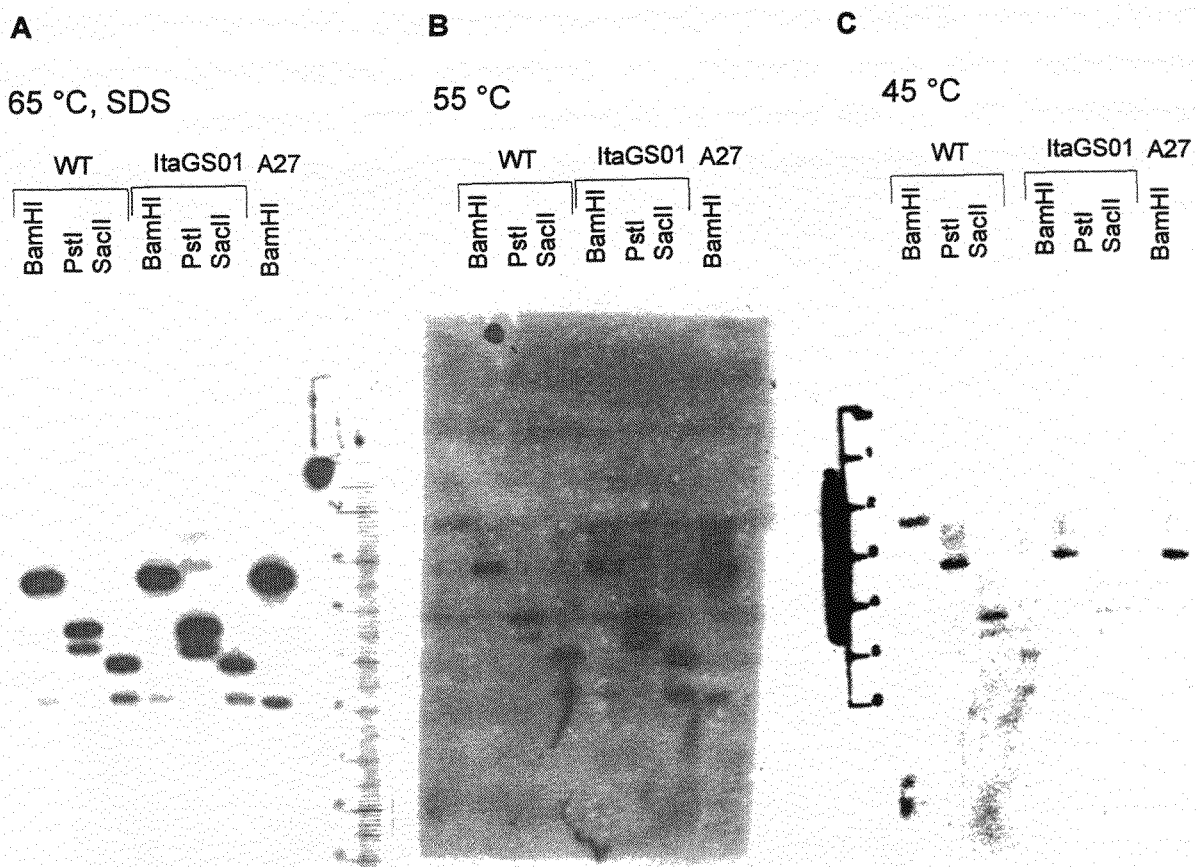


Abb. 36: Southernblot-Analyse von *A. gossypii* genomischer DNA. Genomische DNA der Stämme WT ATCC10895, ItaGS01 und A27 wurde mit den Enzymen *Bam*HI, *Pst*I und *Sac*II verdaut. (A) Hybridisierung bei 65 °C, 1 % SDS (B) Hybridisierung bei 55 °C (C) Hybridisierung bei 45 °C

Zur Disruption des chromosomalen Locus von *AgVMA1* wurde ein *VMA1*-Deletions/Substitutions-Allel, genannt *vma1::g418*, konstruiert. Hierfür wurde ein von den Schnittstellen *Bam*HI-*Pst*I flankiertes Teilstück des *VMA1*-PCR-Fragments mit der Geneticin-Resistenz-Kassette *TEF-G418* ersetzt. Die verwendete Resistenz-Kassette steht unter der Kontrolle der Promoter- und Terminator-Sequenz der *A. gossypii*-*TEF*-Gene (Steiner *et al.*, 1995). Für die Disruption wurde das amplifizierte PCR-Fragment (s.o.) durch Restriktion mit *Nco*I-SpeI aus dem Plasmid pJR1685 isoliert und in die Polylinker-site eines modifizierten pGEM[®]T

III. ERGEBNISSE

Vektor kloniert (ΔP_{stf}), wodurch das Plasmid pJR1767 erzeugt wurde. Zur Disruption des Gens wurde die 0,25 kb-*Bam*HI-*Pst*I-Region mit dem 2 kb-*TEF-G418*-Marker ersetzt, wodurch das Plasmid pJR1773 erzeugt wurde (**Abb. 37A**). Das 2,5 kb lange *vma1::g418*-Fragment wurde durch Restriktionsverdau aus dem Plasmid freigesetzt und zur Transformation gekeimter Sporen von *A. gossypii* ATCC10895 (WT), ItaGS01 und A27 durch Elektroporation (s. II.6.4.2.) verwendet. DNA-Integration wird bei dieser Methode durch homologe Rekombination erreicht. Geneticin-resistente (heterokaryonte) Klone wurden auf 250 μ g/ml Geneticin selektiert und nochmals sporuliert. Homokaryonte *G418^R*-Transformanden (*vma1::g418*) wurden nach Sporulation und erneuter Selektion auf Geneticin-Platten erhalten. Die Disruption des *VMA1*-Gens wurde nach Präparation genomischer DNA durch „Bandshift“ im Southern-Blot bestätigt (**Abb. 37B**). Die neuerhaltenen Disruptanten werden im folgenden als A4-1773 (Ausgangsstamm ATCC 10895), A27-1773 (Ausgangsstamm A27) und Ita-1773 (Ausgangsstamm Ita-GS-01) bezeichnet.

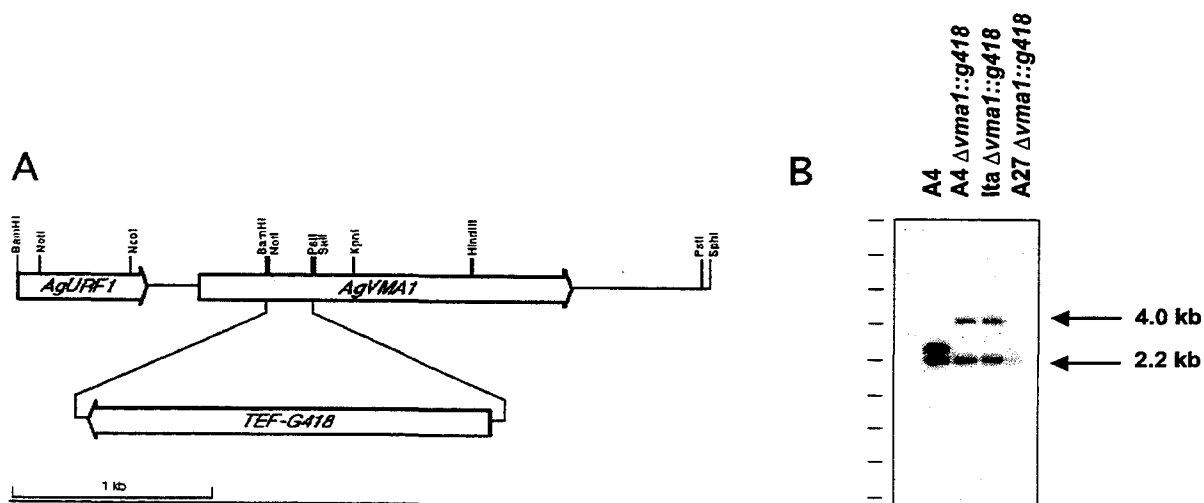


Abb. 37: Disruption von *AgVMA1* mit der Geneticin-Resistenzkassette *TEF-G418*.
(A) Schematische Darstellung der Konstruktion des zur Disruption von *AgVMA1* eingesetzten Deletions-/ Substitutionsallels auf pJR1773,
(B) Southern-Analyse zum Nachweis der Disruption von *VMA1*.

A4 \equiv ATCC 10895 (WT)

2.4.3. Physiologie des *Agvma⁻* Phänotyp

Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß die Disruption des *VMA1*-Gens die Zellen physiologisch stark beeinflusst (Finbow und Harrison, 1997). Die erhaltenen Mutanten wachsen nur in einem engen pH-Bereich um 5,5. Sie wachsen nicht auf nicht-vergärbaren C-Quellen, außerdem konnte eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität nachgewiesen werden.

Die Kolonien der AgVMA1-Disruptanten wiesen einen von den Ausgangsstämmen distinkten Phänotyp auf (**Abb. 38**). Die Disruptanten zeigten auf Platte charakteristische, dicht/kraterartig wachsende Kolonien im Gegensatz zum flächigen Wachstum der Ausgangsstämme. Die Morphologie der Zellen war jedoch den Ausgangsstämmen gleich, unter dem Phasenkontrastmikroskop konnte hyphenartiges Wachstum und die Ausbildung von Vakuolen beobachtet werden. Die Riboflavinproduktion in den Disruptanten A27-1773 und Ita-1773 wurde zunächst qualitativ durch die Anreicherung des Vitamins in den Agarplatten nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Ausgangsstämmen erschienen die Zellen jedoch farblos, ein erster Hinweis auf eine Umlenkung der Riboflavinflüsse ins Medium durch die VMA1-Disruption. **Abb. 38** zeigt repräsentativ Kulturen von ItaGS01 und Ita-1773 auf HA-Agarplatten (s. II.3.).

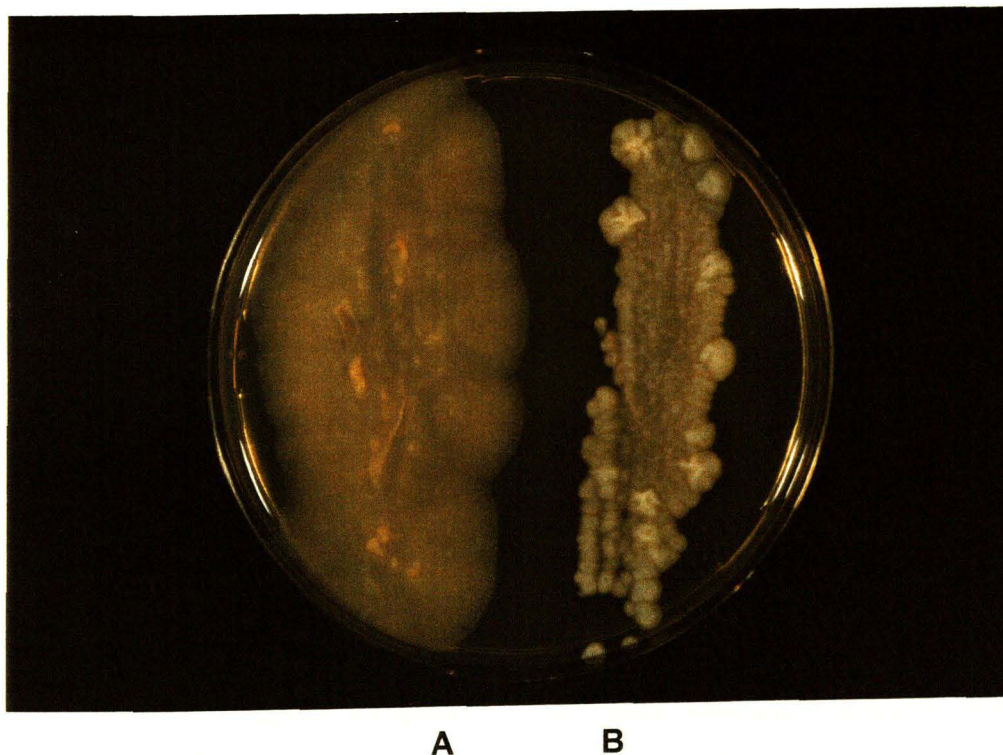


Abb. 38: Wachstum und Riboflavinbildung in den *A. gossypii*-Stämmen ItaGS01 und Ita-1773 auf HA-Agarplatten mit 6 g/l Glycin. **(A)** ItaGS01, **(B)** Ita-1773.

Zur Charakterisierung der Wachstumsparameter des Agvma⁻-Phänotyp wurde die Länge der Lag-Phase, die im stationären Zustand gebildete Biomasse und die Effekte von unterschiedlichen pH-Werten und Ca²⁺-Gehalten auf Glucose-Medium (HA, s. II.3.) zwischen WT und Disruptante A4-1773 verglichen (**Tab. 14**).

III. ERGEBNISSE

Tab. 14: Wachstum der *A. gossypii* Stämme ATCC 10895 (WT) und Disruptante A4-1773 auf verschiedenen Flüssigkulturen

Stamm	Medium	Biotrockenmasse nach 30 h (g/ l)	Lag-Phase (h)	Wachstumsrate μ (h ⁻¹)
Wildtyp				
ATCC 10895	HA, pH 7,5	5,8 ± 0,20	5,2 ± 0,5	0,47 ± 0,03
ATCC 10895	HA, pH 6,8	5,7 ± 0,20	5,0 ± 0,5	0,48 ± 0,04
ATCC 10895	HA, pH 5,3	5,3 ± 0,30	5,6 ± 1,0	0,42 ± 0,07
ATCC 10895	HA, pH 6,8, 100 mM Ca ²⁺	6,1 ± 0,20	5,1 ± 0,6	0,48 ± 0,04
ATCC 10895	10 g/ l Sojaöl 10 g/ l Hefeextrakt	6,5 ± 0,34	5,0 ± 0,5	0,50 ± 0,04
<i>vma1::g418</i>				
A4-1773	HA, pH 7,5	6,2 ± 0,25	12,5 ± 1,5	0,30 ± 0,06
A4-1773	HA, pH 6,8	5,7 ± 0,27	12,5 ± 1,6	0,27 ± 0,05
A4-1773	HA, pH 6,2	5,4 ± 0,40	10,0 ± 1,0	0,33 ± 0,03
A4-1773	HA, pH 5,9	5,8 ± 0,43	7,5 ± 0,7	0,37 ± 0,02
A4-1773	HA, pH 5,6	4,7 ± 0,42	12,0 ± 1,2	0,16 ± 0,03
A4-1773	HA, pH 5,3	4,2 ± 0,60	12,0 ± 2,1	0,12 ± 0,05
A4-1773	HA, pH 6,8, 100 mM Ca ²⁺	4,6 ± 0,30	12,5 ± 1,9	0,28 ± 0,04
A4-1773	10 g/ l Sojaöl 10 g/ l Hefeextrakt	6,3 ± 0,32	12,0 ± 1,5	0,30 ± 0,04

Im Gegensatz zu Hefe und *N. crassa* war ein Wachstum der Disruptantenzellen auf Glucose-Vollmedium, pH 6,8, möglich. Die Wachstumskurven von A4-1773, A27-1773 und Ita-1773 waren deckungsgleich, so daß in **Tab. 14** nur repräsentativ die Ergebnisse zu A4-1773 vorgestellt wurden. Durch die Disruption des *VMA1* Gens wurde eine Verlängerung der Lag-Phase des Wachstums von 5 h auf 12 h verursacht (**Tab. 14**). Die Wachstumsrate μ war um 44 % erniedrigt, die Ausbeute an Biomasse im stationären Zustand jedoch unverändert. Wachstum auf der nicht-vergärbaren C-Quelle Sojaöl war möglich und wies dem Wachstum auf Glucose-haltigem Medium entsprechende Wachstumsparameter auf (**Tab. 14**). Die Effekte verschiedener pH-Werte im Medium auf das Wachstum der Disruptanten wurden überprüft. **Tab. 14** zeigt das Wachstum der Disruptanten über einen breiten pH-Bereich von 5,3 bis 7,5 in Flüssigkultur. Über den gesamten pH-Bereich konnten die Wachstumsparameter des WT nicht erreicht werden. Die Mutantenzellen wuchsen entgegen der Erfahrungen bei *S. cerevisiae* besser bei neutralem pH als unter sauren

Bedingungen. Obwohl die V-ATPase nachweislich eine Rolle in der cytosolischen pH- und Ca^{2+} -Homöostase spielt, waren *A. gossypii* VMA1-Disruptanten auch kaum sensitiv gegenüber erhöhten Ca^{2+} -Bedingungen (100 mM) (Tab. 14).

Ein qualitativer Vergleich des vakuolären pH von WT und Disruptante wurde über einen Test auf Acridin-Orange-Akkumulation in den Vakuolen erbracht (Abb. 39). Wie schon unter III.2.2. beschrieben, wird dieser Farbstoff nur in sauren Kompartimenten akkumuliert, da er durch Protonierung membranimpermeabel wird. Im Gegensatz zum WT wurde keine Akkumulation des Farbstoffes in den Vakuolen der Disruptante A4-1773 detektiert (Abb. 39). Die fehlende Ansäuerung des vakuolären Kompartiments ließ auf eliminierte V-ATPase Aktivität schließen.

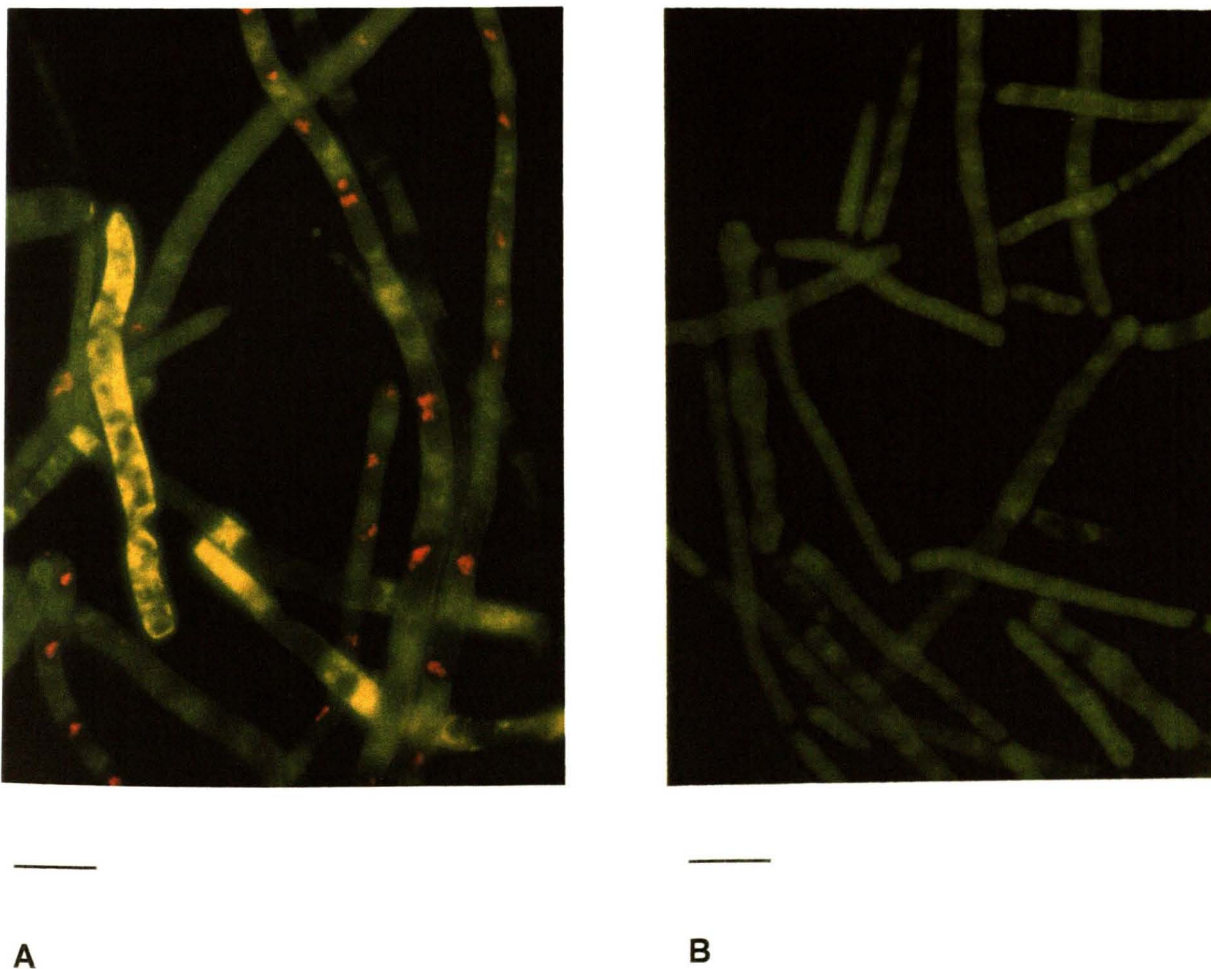


Abb. 39: Acridin Orange-Färbung von **(A)** *A. gossypii* ATCC10895 (WT) und **(B)** Disruptante A4-1773. Der Eichstrich entspricht 20 μm .

Eine deutliche physiologische Beeinträchtigung der VMA1-Disruptanten wurde hinsichtlich des Zellzyklus beobachtet. Generative Vermehrung (Sporulation) konnte in keinem Falle für die Disruptanten beobachtet werden, hierfür wurden die Zellen nach Wachstum auf allen in Tab. 14 aufgeführten Medien sowie auf dem Sporulationsmedium SMASH (s. II.3.), jeweils in fester und flüssiger Form, auf ihre Sporulationsfähigkeit untersucht.

III. ERGEBNISSE

Zur weiterführenden biochemischen Charakterisierung der Disruptanten wurden aus hochreinen Vakuolenfraktionen (s. II.4.8.) Membranpräparationen vorgenommen (s. II.5.1). Die ATP-Hydrolyseaktivität der V-Membranen von WT und Disruptante wurden verglichen (Tab. 15).

Tab. 15: V-ATPase Aktivität in vakuolären Membranen von *A. gossypii* ATCC 10895 (WT) und der VMA1-Disruptante A4-1773 in vakuolären Membranpräparationen

Stamm	Protein (mg)	α -Mannosidase (nmol/ min*mg)	ATPase (nmol/ min)	ATPase (nmol/ min*mg)
ATCC 10895	1,94	10,74	2,13	1,1
A4-1773	2,50	11,30	0	0

Vakuoläre Membranen des WT hydrolysierten ATP mit einer spezifischen Aktivität von 1,1 nmol/ min*mg Protein bei pH 7,5. Vakuoläre Membranen der VMA1-Disruptante A4-1773 zeigten erwartungsgemäß keine vakuoläre H⁺-ATPase Aktivität (Tab. 15). Proteingehalt und α -Mannosidase-Aktivität der Präparationen waren vergleichbar (Tab. 15). Dieses Ergebnis zeigt, daß Untereinheit A für die Aktivität der V-ATPase auch in *A. gossypii* essentiell ist.

Die vakuoläre Akkumulation bestimmter Aminosäuren in *Ashbya* wurde bereits beschrieben (s. III.2.2.2.). Durch selektive Permeabilisierung von Plasmamembran und Tonoplast wurde die intrazelluläre Verteilung der vakuolären Aminosäuren Glycin, Lysin und Arginin in WT \pm 5 μ M CCA sowie in der dazugehörigen Disruptante A4-1773 quantifiziert (Tab. 16). In diesem Zusammenhang war die Glycin-Verteilung in *A. gossypii* von besonderem Interesse. Glycin als Bestandteil des Ausgangsmetaboliten GTP in der *de novo*-Purinbiosynthese stellt als Riboflavinvorstufe einen für die Produktion limitierenden Faktor dar (Demain, 1972; Monschau, 1998; Monschau *et al.*, 1998).

Tab. 16: Relative Verteilung verschiedener Aminosäuren in ATCC10895 (WT) \pm 5 μ M CCA und A4-1773

Aminosäure- verteilung	relative Verteilung [%]		
	ATCC10895	ATCC10895, 5 μ M CCA	A4-1773
Glycin			
Cytosol	8,5 \pm 2,5	20,0 \pm 2,3	12 \pm 1,7
Vakuole	47,9 \pm 2,3	9,5 \pm 1,2	5 \pm 1,3
Medium	43,6 \pm 2,8	70,5 \pm 5,0	83 \pm 4,8
Lysin			
Cytosol	9,1 \pm 1,3	11,1 \pm 1,6	14 \pm 4,0
Vakuole	31,3 \pm 0,5	1,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,7
Medium	59,6 \pm 0,8	87,6 \pm 1,0	84 \pm 0,4
Arginin			
Cytosol	n. d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹
Vakuole	37 \pm 7,0	n.d. ¹	n.d. ¹
Medium	63 \pm 13,0	100 \pm 10,0	100 \pm 8,0

¹n.d. = nicht detektierbar, unterhalb 1 μ M

In den Kontrollzellen treten die Aminosäuren hauptsächlich in Vakuole und umgebenden Medium auf, werden also exportiert oder in die Vakuole sezerniert. Der cytosolische Anteil macht in keinem Fall mehr als 10 % der Gesamtproduktion aus. Für die Verteilung der intrazellulären Gehalte liegt der cytosolische Anteil im Falle von Lysin bei etwa 23 % und für Glycin bei 15 %. Cytosolisches Arginin konnte nicht nachgewiesen werden. In CCA-gehemmten Zellen und in den Disruptanten findet eine Umlenkung von 80 % des vakuolären Glycin-, von 96 % des vakuolären Lysin- und des kompletten vakuolären Arginin-Gehalts ins Medium statt. Diese Ergebnisse bestätigen die für andere Pilze beschriebene essentielle Rolle der V-ATPase für die vakuoläre Akkumulation von Aminosäuren in *A. gossypii*.

2.4.4. Stoff-Flußumlenkung von Riboflavin durch die Disruption von AgVMA1

Im Lichtmikroskop wird deutlich, daß der stark produzierende Ausgangsstamm ItaGS01 in den Vakuolen akkumuliert Riboflavinkristalle enthält, die Disruptante Ita-1773 hingegen farblos ist (**Abb. 40**). Das Aussehen der Stämme A27 und A27-1773 ist entsprechend.

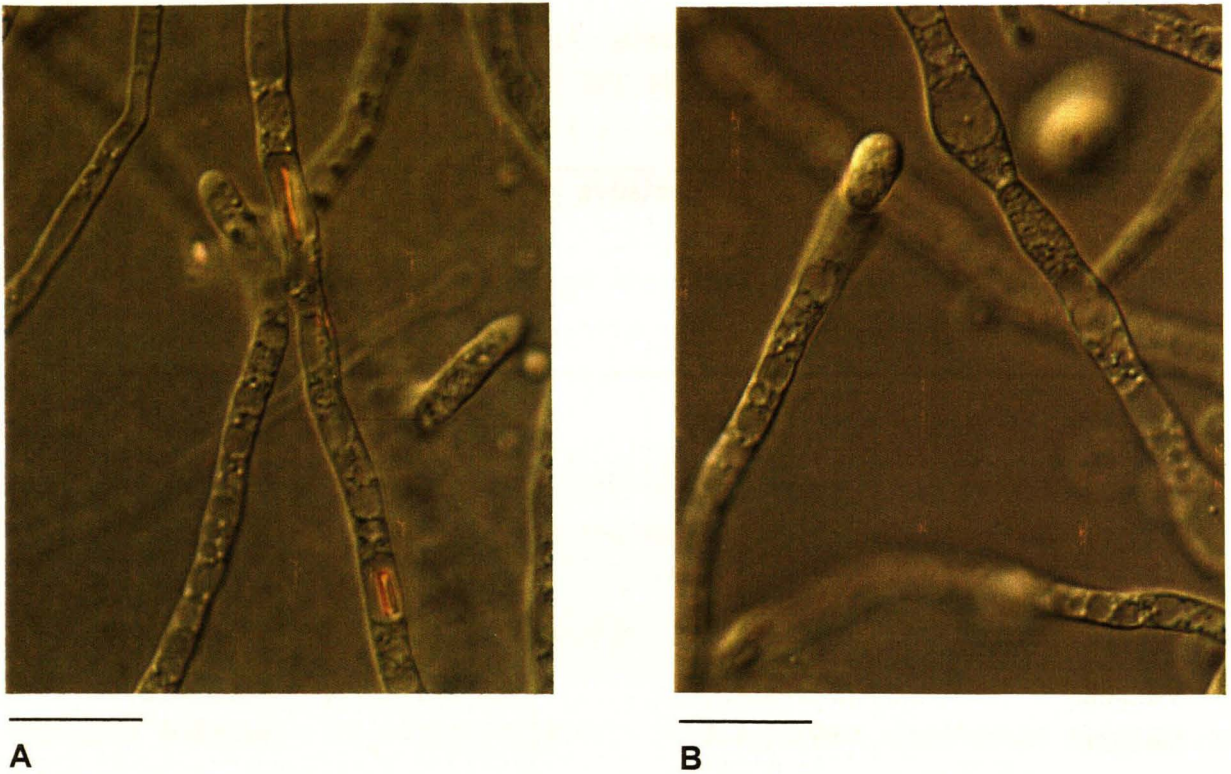
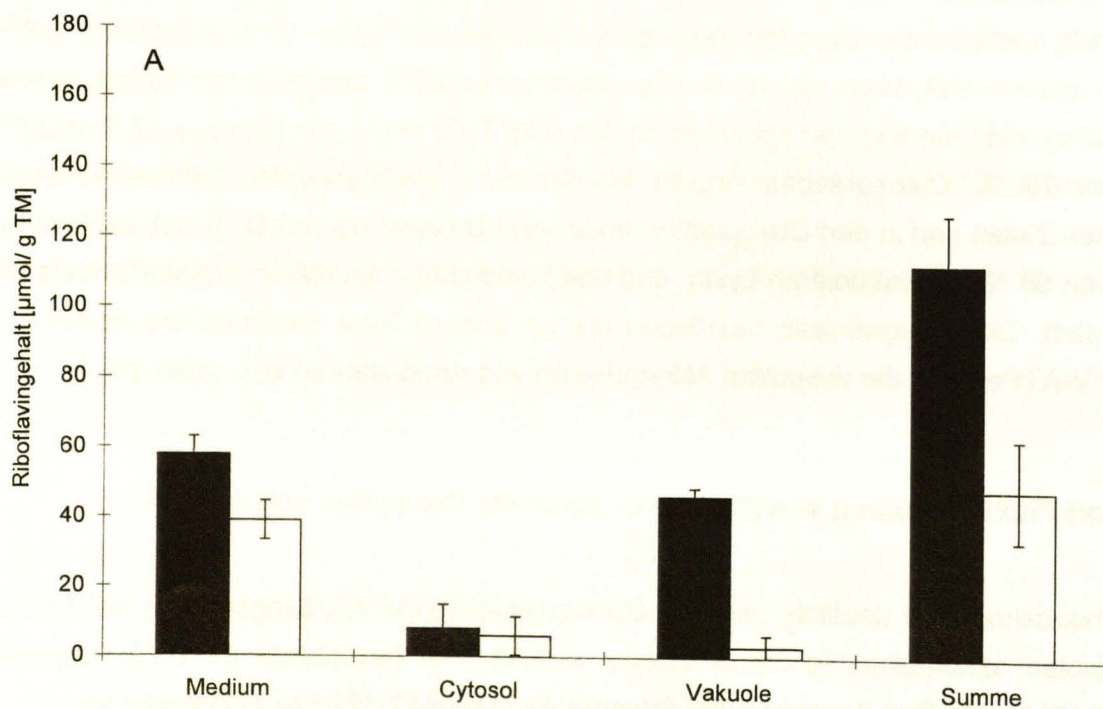


Abb. 40: Phasenkontrast-Mikrographie der Stämme **(A)** ItaGS01 und **(B)** Ita-1773 nach 3 Tagen auf Produktionsmedium (s. II.3.). Der Eichstrich entspricht 20 µm.

Die intrazelluläre Verteilung von Riboflavin in den beiden Mutanten Ita-1773 und A27-1773 wurde mithilfe der selektiven Membranpermeabilisierung (s.II.4.9.) quantifiziert.



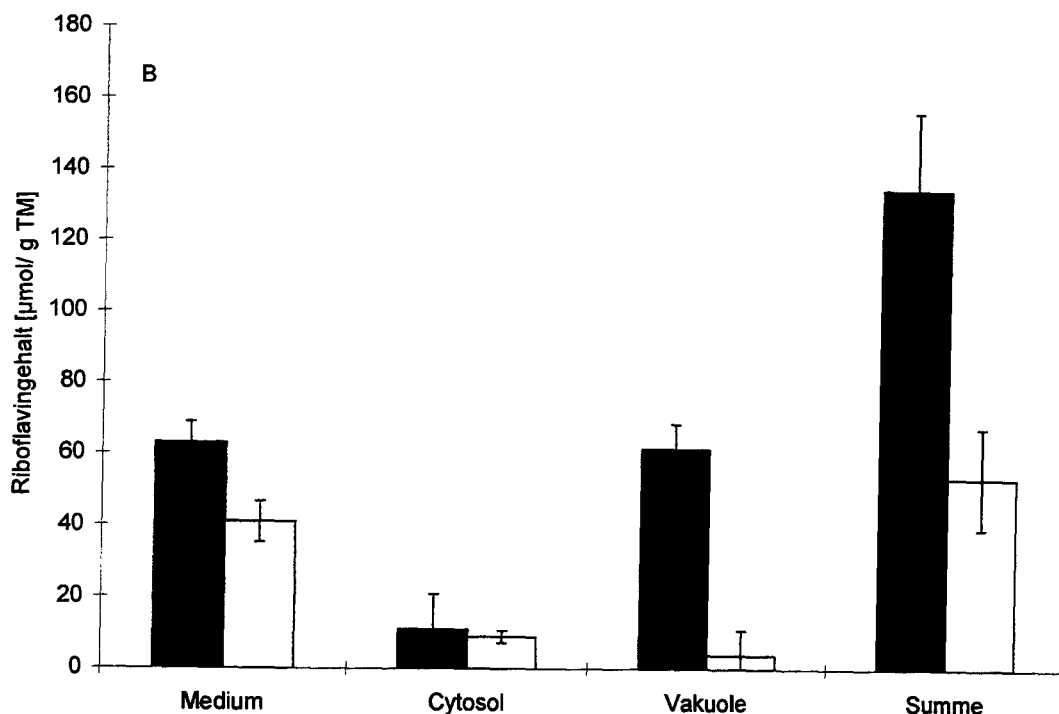


Abb. 41: Produktivität und intrazelluläre Verteilung von Riboflavin in Ausgangsstämmen und VMA1-Disruptanten von (A) ItaGS01 und (B) A27 nach 70 h, ■ Ausgangsstamm □ VMA1-Disruptante

Mit den VMA1-Disruptanten A27-1773 und Ita-1773 wurde die Umlenkung der Riboflavinflüsse von der Synthese direkt ins Produktionsmedium realisiert. Die Zellen beider Stämme zeigten jedoch eine eingeschränkte Produktionsfähigkeit, die Ausbeute betrug nur 60 % der Ausgangsstämme.

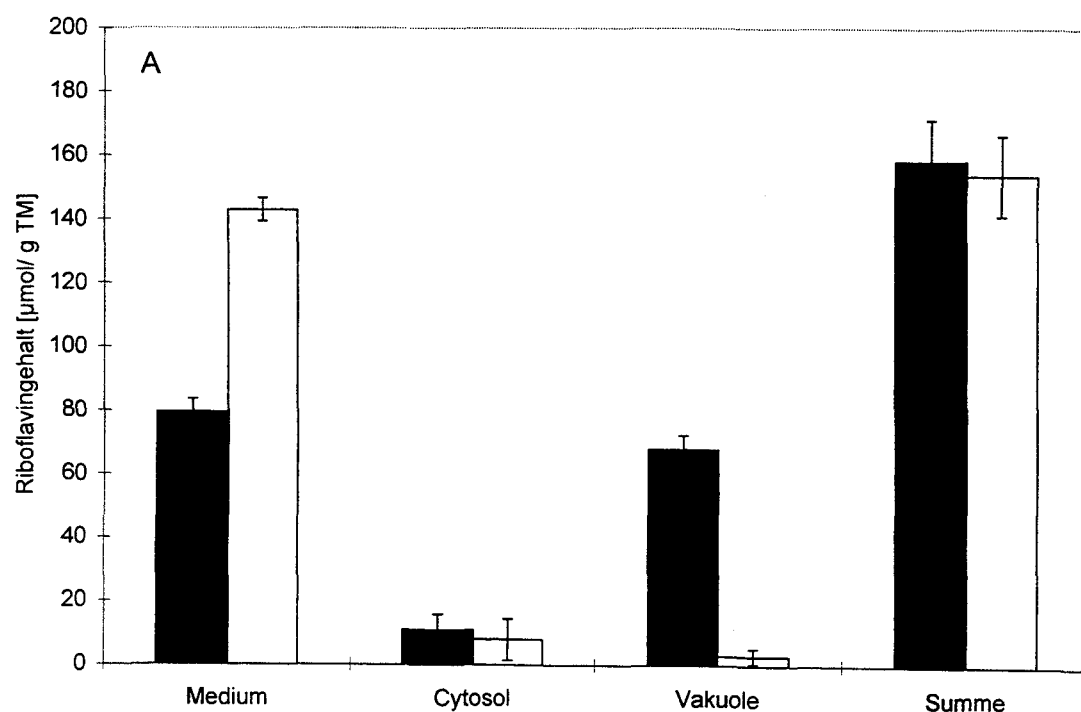
Durch Zwischenschalten einer zusätzlichen (zweiten) Vorkultur konnte Adaptation der Zellen in Wachstum und Produktion erreicht werden. Die Wachstumsparameter der „3. Generation“ auf HA-Vollmedium und Produktionsmedium (s. II.3.) entsprachen denen der Ausgangsstämme. Über Geneticin-Resistenz der Zellen wurde in den Wachstumsversuchen ein Verlust der Disruption in den adaptierten Zellen ausgeschlossen. In Tab. 17 sind repräsentativ die Wachstumsparameter von ItaGS01 und Ita-1773 nach Adaptation verglichen.

III. ERGEBNISSE

Tab. 17: Wachstum der *A. gossypii* Stämme ItaGS01 und der Disruptante Ita-1773 nach vollständiger Adaptation

Stamm	Medium (250 µg/ ml Geneticin)	Biotrockenmasse nach 30 h (g/ l)	Lag- Phase (h)	Wachstums- rate μ (h^{-1})
Ausgangsstamm				
ItaGS01	HA, pH 6,8	$5,8 \pm 0,60$	$6,0 \pm 0,7$	$0,51 \pm 0,02$
ItaGS01	10 g/ l Sojaöl 10 g/ l Hefeextrakt	$6,5 \pm 0,61$	$6,2 \pm 0,2$	$0,47 \pm 0,05$
<i>vma1::g418</i>				
Ita-1773	HA, pH 6,8	$5,7 \pm 0,47$	$6,5 \pm 1,6$	$0,49 \pm 0,05$
Ita-1773	10 g/ l Sojaöl 10 g/ l Hefeextrakt	$6,6 \pm 0,32$	$7,0 \pm 0,5$	$0,49 \pm 0,04$

Insbesondere die Produktivität der adaptierten Zellen war völlig wiederhergestellt. **Abb. 42** zeigt, daß nach hinreichender Adaptation die Produktivität von Ausgangsstämmen und Disruptanten der Überproduzenten ItaGS01 und A27 gleich ist, und die Daten der beiden überproduzierenden Mutanten ItaGS01 und A27 konsistent sind.



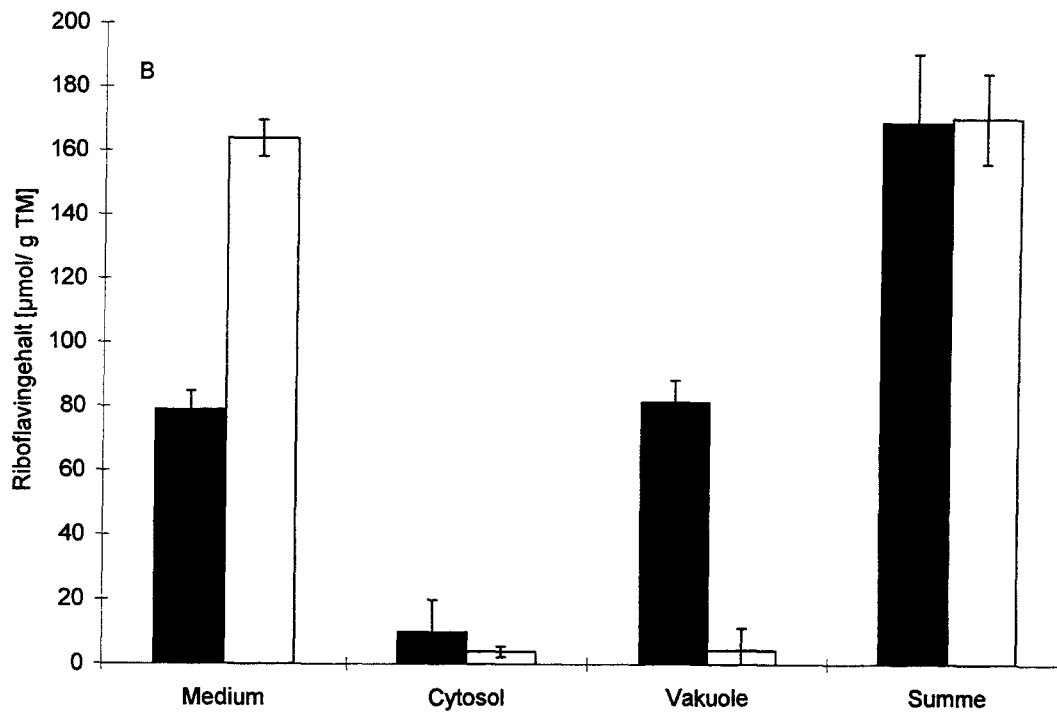


Abb. 42: Absolute Riboflavin-Verteilung in Ausgangsstämmen und Disruptanten von (A) ItaGS01 und (B) A27 nach 70 h nach vorangegangener vollständiger Adaptation, ■ Ausgangsstamm □ VMA1-Disruptante

In den adaptierten Zellen findet bei den Ausgangsstämmen vergleichbarer Produktivität eine vollständige Umlenkung der Riboflavinflüsse ins umgebende Medium statt. Eine Akkumulation in der Vakuole wurde nicht mehr detektiert. Der cytosolische Riboflavingehalt war leicht erniedrigt. Der Vergleich der Effekte von Disruption und Inhibition mittels CCA wurde nur noch anhand des Stammes ItaGS01 und der dazugehörigen Disruptante Ita-1773 vorgenommen (Abb. 43).

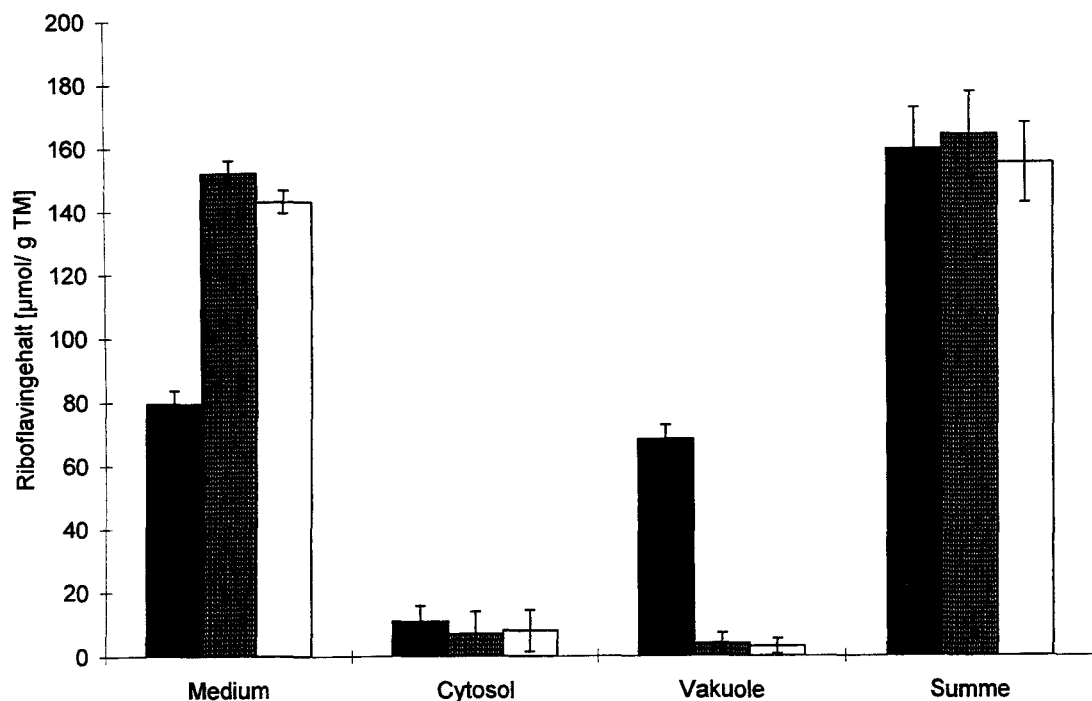


Abb. 43: Vergleich der Effekte von CCA-Hemmung und *VMA1*-Disruption auf die Produktivität und Verteilung von Riboflavin, ■ ItaGS01 ▨ ItaGS01, 5 µM CCA □ Ita-1773

Die Effekte von Disruption und Inhibition mit CCA gleichen sich bezüglich der Stoff-Flußumlenkung. Durch die Disruption stehen drei neue Stämme ohne vakuoläre Riboflavinakkumulation (Produkt-Retention) zur Verfügung, deren Produktivität nach Adaptation mit der der Ausgangsstämme vergleichbar ist.

2.4.5. Riboflavinexport der *VMA1* Disruptante Ita-1773

Mit der *vma1*-Disruptante steht ein System zur Analyse des Riboflavin-Transports über die Plasmamembran ohne überlagernde Effekte des Vakuolentransports zur Verfügung. Die Exportraten des überproduzierenden Stammes ItaGS01 und der dazugehörigen Disruptante Ita-1773 nach 45 h Wachstum auf Sojaöl wurden verglichen, indem die Zellen geerntet und in C-Quelle-freien NaP_i -Puffer resuspendiert wurden (s. II.4.10.) (**Abb. 44**).

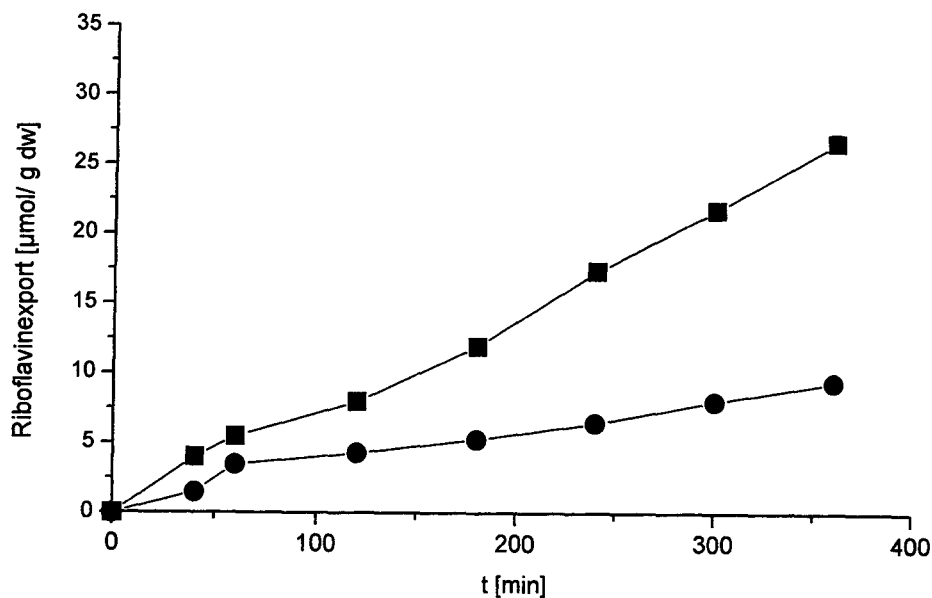


Abb. 44: Riboflavinexport von ■ ItaGS01 und ● Ita-1773 in NaPi_7 -Puffer

Im Vergleich zu einer Exportrate von $65 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg TM}^{-1}$ erreicht die Disruptante nur etwa 52 % Aktivität. Die Exportrate betrug im Exportversuch ohne Zusatz einer C-Quelle (s. II.4.10.) nur $33,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg TM}^{-1}$, was ein Hinweis auf einen im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöhten Energiebedarf dieser Zellen für den Export sein könnte.

Weiterhin wurden die Exportkapazitäten von Ita-1773 zu verschiedenen Zeitpunkten der Produktionsphase ermittelt. Die erhaltenen Exportraten wurden mit denjenigen des Ausgangsstammes ItaGS01 verglichen, die unter III.2.1.2 bestimmt wurden. Während für ItaGS01 im Verlaufe der Produktionsphase eine Steigerung der Exportaktivität mit der Zeit um mehrere hundert Prozent ermittelt wurde, nahm die Aktivität des Exports in der Disruptante stetig ab. In der späten Produktionsphase konnte im C-Quelle-freien Puffersystem kein Export mehr gemessen werden (**Abb. 45**).

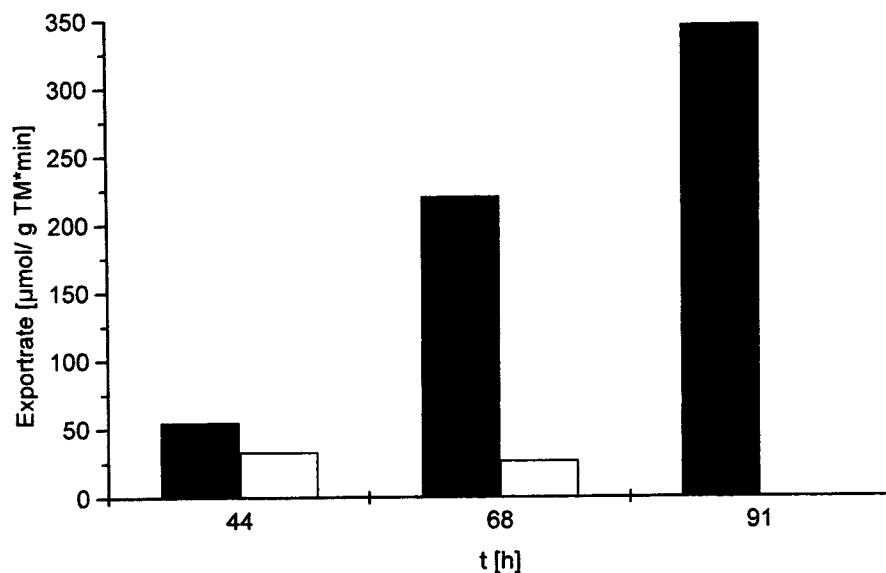


Abb. 45: Riboflavinexportraten in verschiedenen Abschnitten der Produktionsphase,
□ ItaGS01 und ■ Ita-1773

2.5. 2-D-Gelelektrophorese und Screening nach dem vakuolären Riboflavin-Carrier

Durch Disruption des für die Untereinheit A der vakuolären ATPase codierenden *VMA1*-Gens konnte eine Stoff-Flußumlenkung des produzierten Riboflavins vom Cytosol direkt ins Medium erreicht worden (III.2.4.4.). Wachstum und Produktivität waren jedoch erst nach Adaptation mit den Ausgangsstämmen vergleichbar. Ein physiologisch die Stämme weniger beeinträchtigende Alternative zur Disruption der V-ATPase könnte die Deletion des für den vakuolären Riboflavintransporter kodierenden Gens darstellen.

Für die Isolierung des vakuolären Riboflavintransporters oder des codierenden Gens steht kein Screeningsystem zur Verfügung. Zellen, die intravakuolär kein Riboflavin mehr akkumulieren, können u.a. auch eine dysfunktionale V-ATPase besitzen. Eine Möglichkeit, den vakuolären Riboflavincarrier zu isolieren, könnte sich durch die unterschiedlich stark ausgeprägte Akkumulation von Riboflavin zwischen WT, der Mutante ItaGS01 und der Disruptante Ita-1773 ergeben. Es wurde erwartet, daß die Expression des vakuolären Riboflavincarriers (s.III.2.3.2.) reguliert ist, die Proteinmenge sich also in Abhängigkeit der gebildeten und in die Vakuole zu transportierenden Riboflavinmenge ändert. Es sollte daher überprüft werden, ob zwischen Wildstamm (leichte Riboflavinakkumulation in der Vakuole), *VMA1*-Disruptante (keine Riboflavinakkumulation in der Vakuole) und ItaGS01 (starke Riboflavinakkumulation in der Vakuole) ein Unterschied im Proteinmuster deutlich wurde.

Eine geeignete Methode für die Analyse der vakuolären Membranproteine ist beispielsweise die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE).

Als weiterführender Ansatz konnte in dieser Arbeit die methodische Grundlage zur Proteinanalyse vakuolärer Membranen von *A. gossypii* über 2-D-PAGE etabliert werden. Für die cytoplasmatischen Proteine wurde eine vergleichbar gute Auflösung jedoch noch nicht erreicht. Die Präparation von Vakuolenmembranen wurde wie unter II.5.1. beschrieben durchgeführt und nur hochreine Präparationen zur 2-D-PAGE eingesetzt. **Abb. 46** zeigt eine 2-D-PAGE von V-Membranproteinen der Stämme WT, ItaGS01 und A4-1773.

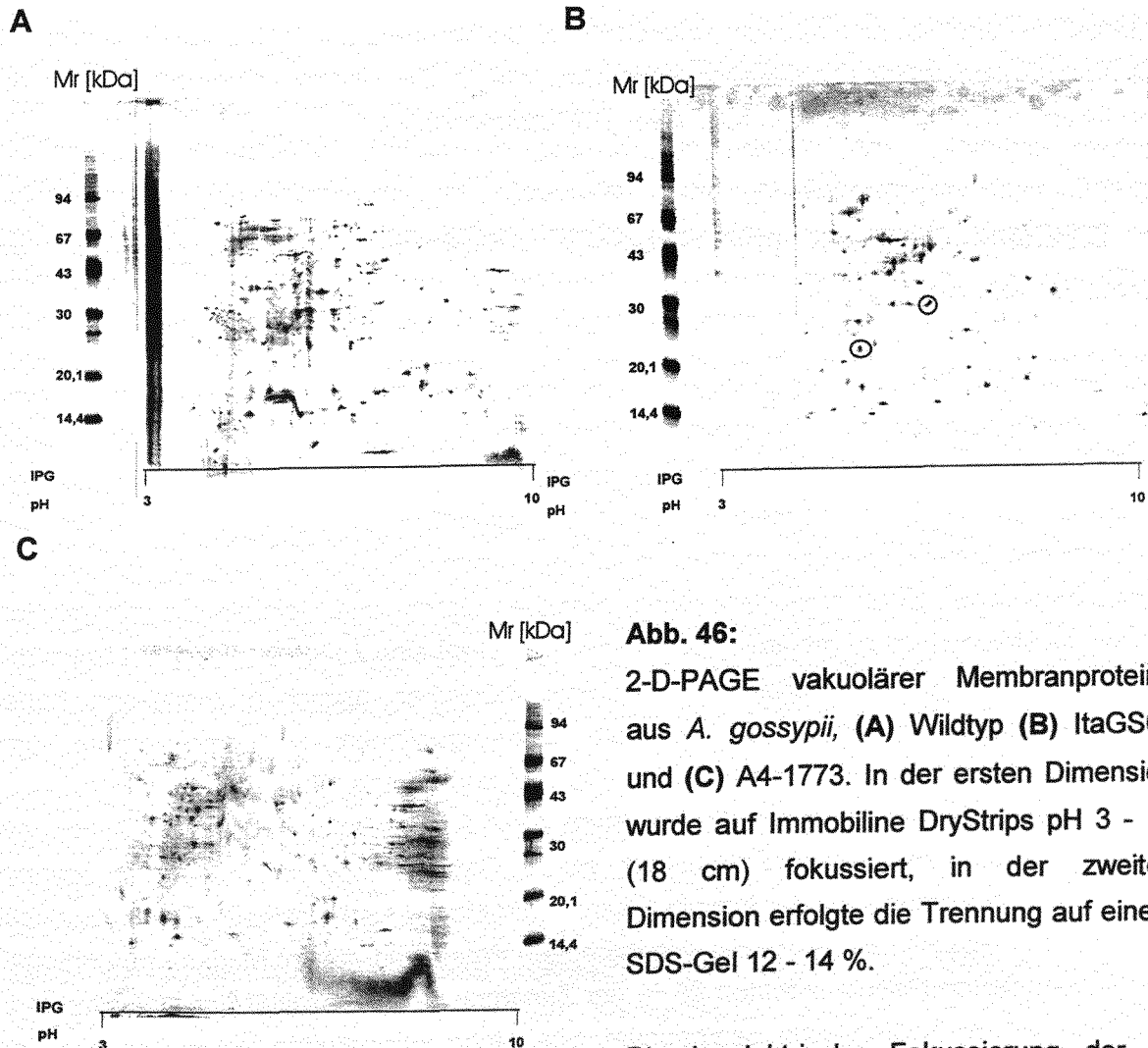


Abb. 46:

2-D-PAGE vakuolärer Membranproteine aus *A. gossypii*, (A) Wildtyp (B) ItaGS01 und (C) A4-1773. In der ersten Dimension wurde auf Immobiline DryStrips pH 3 - 10 (18 cm) fokussiert, in der zweiten Dimension erfolgte die Trennung auf einem SDS-Gel 12 - 14 %.

Die isoelektrische Fokussierung der V-Membranproteine war nach dreistündigem Solubilisieren in Triton-haltiger *Sample solution* bei 30 °C (vgl. II.5.5.) erfolgreich. In Silber-gefärbten Auftrennungen von Membranfraktionen wurden etwa 100 Proteine detektiert (**Abb. 46**). Um über Analyse der Proteinmuster Spots verschiedener Intensität zu identifizieren, wurden die Proteinmuster der V-Membranen von Wildtyp, ItaGS01 und der Disruptante A4-1773 ausgewertet und verglichen. Es konnten bislang 2 Spots detektiert werden, die im Proteinmuster der Mutante ItaGS01 mit höherer Spot-Intensität auftraten (**Abb. 46B**). Das Identifizieren dieser Proteine durch Mikrosequenzieren steht noch aus.

IV. Diskussion

Der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii* produziert bei Wachstum auf Sojaöl erhebliche Mengen an Riboflavin. Der Membrantransport von Riboflavin kann neben den spezifischen Reaktionsschritten der Biosynthese für die Produktion limitierend sein. Für eine effektive Produktion spielt daher der Transport von Riboflavin, insbesondere seine Exkretion, eine zentrale Rolle. Riboflavintransport in *A. gossypii* ist bis heute nicht charakterisiert. Die in dieser Arbeit dazu durchgeführten Untersuchungen gliederten sich in die Aufklärung der Adaptationsvorgänge an hyperosmotischen Streß, der während der Fermentation auftritt und die Riboflavinexkretion nachweislich erniedrigt, und in die Charakterisierung der für die Produktion relevanten zellulären Riboflavin-Transportprozesse.

1. Biochemische und physiologische Adaptation von *A. gossypii* an hyperosmotischen Streß

Der filamentöse Pilz *A. gossypii* ist in seinem Habitat wie auch während der Fermentation zur Riboflavinproduktion hyperosmotischem Streß ausgesetzt. Im subtropischen Lebensraum des Pilzes manifestiert sich dieser hauptsächlich als Trockenstreß, der wie hyperosmotischer Streß Strategien gegen Wasserverlust der Zelle erfordert. In den vorgestellten Untersuchungen wurden die Adaptationsmechanismen von *A. gossypii* an hyperosmotischen Streß analysiert, wobei zwischen Osmo- und Halotoleranz differenziert wurde. Im Unterschied zu reinem hyperosmotischen Streß sind Zellen im Falle von Salzstreß zusätzlich zur Hyperosmolalität des Mediums möglichen toxischen Einflüssen hoher Ionenkonzentrationen ausgesetzt, weshalb Mikroorganismen in osmotolerante und halotolerante Organismen unterteilt werden (Galinski und Herzog 1990; Csonka 1989).

A. gossypii reagiert auf hyperosmotischen Streß durch Akkumulation kompatibler Solute. Als vorherrschende osmoprotektive Substanz wurde Glycerin bzw. im Falle von Mannit-Belastung eine Kombination der Polyole Glycerin und Mannit nachgewiesen. Die intrazellulär akkumulierte Glycerinmenge war der abnehmenden Wasseraktivität im Medium proportional. Die akkumulierten Polyole machten 85 % der Zunahme der Osmolalität des Zellextrakts in Reaktion auf hyperosmotische Bedingungen aus. Hohe intrazelluläre Polyol-Akkumulation bei erhöhter externer Osmolalität wurde ebenfalls bei den Hefen *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia miso* und den filamentösen Pilzen *Dendryphiella salina*, *Penicillium chrysogenum*, *P. ochro-chloron*, *Chaetomium globosum* und *Aspergillus nidulans* beobachtet (Jennings, 1983). Hierbei konnte neben Glycerin die Akkumulation von Arabit in *D. hansenii* und *Z. rouxii*, Erythritol, Arabit, Mannit, Sorbit und Trehalose in *P. ochro-chloron* sowie Arabit und Mannit in *Aspergillus nidulans* nachgewiesen werden (Jennings, 1983).

Der hohen Osmotoleranz von *A. gossypii* steht eine äußerst niedrige Halotoleranz gegenüber. Das Wachstum und die Morphologie der NaCl-belasteten Zellen unterschied

sich deutlich von unbelasteten Zellen und von Zellen, die unter hoher Mannit-Belastung gewachsen waren. Durch Wachstumsversuche auf verschiedenen Natrium- und Chloridsalzen konnte die Halosensitivität auf Toxizität hoher Na^+ -Konzentrationen im Medium zurückgeführt werden. Hohe Na^+ -Konzentrationen zeigten auch im Falle von *S. cerevisiae* inhibierende Effekte auf das Zellwachstum (Garcia *et al.*, 1997). Schon unter normalen Wachstumsbedingungen enthielt der Zellextrakt von *A. gossypii* ca. 35 mM Na^+ , wahrscheinlich als Gegenion für vakuolär gespeichertes Polyphosphat (Jennings, 1995). Ein Anstieg des intrazellulären Natrium-Gehaltes wurde weder unter Mannit-Belastung noch bei Zusatz hoher NaCl-Konzentrationen (800 mOsm) beobachtet. Offensichtlich werden Na^+ -Ionen von *A. gossypii* zum Schutz der empfindlichen Enzyme aktiv aus dem Cytoplasma exportiert, was für die Existenz eines effizienten aber energieaufwendigen Na^+ -Exportsystems spricht, wie bei *S. cerevisiae* beschrieben (Márquez, 1996). Eine Ablagerung zusätzlicher Natrium-Mengen in die Vakuole zur Erhaltung niedriger cytosolischer Na^+ -Werte ist im Gegensatz zum Ausscheidungsprozess offenbar physiologisch ungünstig. Der hohe Energiebedarf für den aktiven Ausschluß von Natriumionen trägt vermutlich zum verminderten Wachstum von *A. gossypii* in Medien mit hohem Gehalt an Natriumsalzen bei. Im Gegensatz dazu sind die Hefen *Z. rouxii* und *D. hansenii* gegenüber NaCl-Konzentrationen von bis zu 4 M tolerant (Norkrans und Kylin, 1969).

Die neben Beeinträchtigung des Wachstums beobachtete Fraktionierung der Vakuolen unter NaCl-Streß stellt ein für Pilze und Hefen bekanntes, jedoch nicht geklärtes Phänomen unter Mangel- und Streßbedingungen dar (Preston *et al.*, 1989; Calahorra *et al.*, 1998). Fraktionierung der Vakuolen als Reaktion der Pilzzelle auf Salzstreß wurde jedoch erstmals im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Eine wichtige physiologische Funktion der Vakuole ist die Aufrechterhaltung des Zellurgors. Als primäre Reaktion auf hyperosmotischen Schock erfolgt Wassereinstrom aus den Vakuolen ins Cytoplasma, noch bevor kompatible Solute zum Schutz vor Wasserverlust akkumuliert werden können (Latterich und Watson, 1993). Die für Transportprozesse und Wasserein- und -ausstrom wichtige Membranoberfläche wird durch die Fraktionierung der Vakuolen konstant gehalten.

Glyzerin kann in *A. gossypii* in hohen Konzentrationen von bis zu 0,6 M in der Zelle akkumuliert werden. Um die Herkunft dieses kompatiblen Solut aufzuklären, wurden die Zellen auf Glyzerin-Aufnahmeaktivität untersucht. Hierbei konnte die Existenz eines aktiven Glyzerin-Aufnahmesystems in *A. gossypii* nachgewiesen werden. Die Aktivität dieses Aufnahmesystems wurde unter hyperosmotischem Streß jedoch stark vermindert. Eine Inaktivierung der Glyzerinaufnahme unter hyperosmotischem Streß wurde auch für den Glycerin-Facilitator Fps1 von *S. cerevisiae* beobachtet (Luyten *et al.*, 1995). Die negative Regulation des Glyzerin-Aufnahmesystems ist wahrscheinlich eine vorbeugende Maßnahme der Zelle, um Glyzerin-Efflux durch funktionelle Umkehrung des Aufnahmesystems unter dem Druck des hohen nach außen gerichteten Glyzeringradienten zu verhindern. Im Gegensatz dazu wurde in der osmotoleranten Hefe *Pichia sorbitophila* unter hyperosmotischem Streß eine Zunahme in der Aufnahmeaktivität des Glyzerin/ H^+ -Symporters beobachtet. Das System kompensiert Glyzerin-Verluste aus der Zelle durch schnelle Wiederaufnahme und trägt damit zur Osmoadaptation bei (Lages und Lucas,

1995). Glyzerintransport-Defektmutanten dieser Hefe sind erwartungsgemäß osmosensitiv (Oliveira *et al.*, 1996). In der halotoleranten Hefe *Debaryomyces hansenii* wurde ein Na^+ /Glyzerin-Symporter nachgewiesen, und auch für dieses Glyzerin-Aufnahmesystem konnte eine Korrelation zwischen steigender externer NaCl-Konzentration und erhöhter Aufnahmeaktivität gezeigt werden (Adler *et al.*, 1985; Lucas *et al.*, 1990). In diesen Hefen konnten interne Glyzerinkonzentrationen von bis zu 1,5 M nachgewiesen werden, wobei zusätzlich andere Polyole (s.o.) als osmoprotektive Substanzen akkumuliert werden. Neben effektiven Aufnahmesystemen, die mögliche Verluste kompensieren können, ist die geringe Membranpermeabilität für Glyzerin ein weiterer entscheidender Faktor für seine effektive Nutzung als osmoprotektive Substanz. Hierin wurden deutliche Unterschiede zwischen osmosensitiven und osmotoleranten Hefen nachgewiesen (Mager und Varela, 1993; Tokuoka, 1993). Unter hyperosmotischen Bedingungen akkumuliert beispielsweise die osmosensitive Spezies *S. cerevisiae* Glyzerin durch Biosynthese. Gleichzeitig aber wird ein starker Verlust von Glyzerin aus den Zellen beobachtet, wodurch energetisch aufwendige Neusynthese notwendig wird (Edgley und Brown, 1983). Bei osmotischer Belastung mit 1,7 M NaCl im Medium wurde eine 30 - 40fache Steigerung der Glyzerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (GPDH) nachgewiesen (Edgley und Brown, 1983; Blomberg und Adler, 1989). Im Gegensatz dazu erfordert die erhöhte Glyzerin-Biosynthese in den osmotoleranten Hefen *Z. rouxii* (Edgley und Brown, 1983) und *D. hansenii* (André *et al.*, 1988; Larsson *et al.*, 1990) nur eine zweifache Steigerung der NAD^+ -abhängigen GPDH. Diese Organismen halten Glyzerin effizient in der Zelle zurück, basierend auf aktiver Glyzerinaufnahme und einer niedrigen Permeabilität der Plasmamembran (s.u.). Auch in *A. gossypii* wurde unter hyperosmotischem Streß nur eine 3 - 6fache Erhöhung der GPDH-Aktivität gemessen. Der Literatur kann entnommen werden, daß sich die Permeabilität der Plasmamembran für Glyzerin zwischen osmosensitiven und osmotoleranten Eukaryonten unterscheidet: Gancedo (1968) beobachtete beispielsweise, daß die Glyzerin-Permeabilität der extrem osmosensitiven Hefe *C. utilis* mindestens 10^5 mal höher ist als die von *S. cerevisiae*. Brown (1982) zeigte, daß der Glyzerin-Permeabilitätskoeffizient der osmotoleranten Alge *Dunaliella salina* außergewöhnlich niedrig ist ($10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) im Vergleich zu den Werten für Schweine-Erythrozyten ($7 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) und reine Eigelb-Phosphatidylcholin-Vesikel ($5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Diese Beobachtungen sprechen für die Tatsache, daß die Zellmembranen osmotoleranter Zellen und von *A. gossypii* prinzipiell anders aufgebaut sind oder in Reaktion auf hyperosmotische Belastung in ihrer Zusammensetzung verändert werden. Watanabe und Takakuwa (1987) berichteten in Übereinstimmung mit dieser Hypothese, daß sich die Fettsäure-Zusammensetzung und damit die Fluidität der Membranen von *Z. rouxii* nach Transfer in Hochsalz-Medien veränderte. Veränderung in der Phospholipid-Zusammensetzung der Zellmembran von *D. hansenii* bei Zunahme der externen NaCl-Konzentrationen von 0 auf 1,3 M wurde von Tunblad-Johanson *et al.* (1987) beschrieben.

Zusammengefaßt kann die Akkumulation von Glyzerin durch Biosynthese als die vornehmliche Reaktion von *A. gossypii* auf hyperosmotischen Streß betrachtet werden. Die Effizienz dieser zellulären Antwort wird verstärkt durch Abschalten des reversiblen Glyzerin-Aufnahmesystems, schließt aber gleichzeitig das Supplementieren von Medien mit Glyzerin

zur Beschleunigung der Adaptation an hyperosmotischen Streß aus. Ob die Permeabilität der Plasmamembran für Glyzerin in *A. gossypii* unter hyperosmotischem Streß verändert ist, konnte noch nicht hinreichend nachgewiesen werden.

2. Transport und Kompartimentierung von Riboflavin

Die biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen des Riboflavintransports gliedern sich in die Charakterisierung der Aufnahme- und Exportprozesse an intakten Hyphenzellen und in die Analyse der vakuolären Kompartimentierung von Riboflavin.

2.1. Riboflavintransport an intakten Zellen

Nachweis Carrier-vermittelter Riboflavinaufnahme

Die Riboflavin-Aufnahmeaktivität in *A. gossypii* wurde mithilfe von ^{14}C -markiertem Substrat an der Riboflavin-auxotrophen Mutante Lu441 gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse wiesen auf aktive, energieabhängige Aufnahme von Riboflavin in *A. gossypii* hin:

- 1) Michaelis-Menten-Kinetik der Riboflavinaufnahme
- 2) Hemmung des Aufnahmesystems durch den Protonophor DNP
- 3) Kompetitive Hemmung der Riboflavinaufnahme durch FMN und FAD

Die Aufnahme in Abhängigkeit von der angebotenen Substratkonzentration zeigte Sättigungsverhalten. Affinität und maximale Aufnahmegeschwindigkeit des Transports wurden über Michaelis-Menten-Analyse zu $K_M = 40 \pm 12 \mu\text{M}$ und $V_{\max} = 20 \pm 4 \text{ nmol/min} \cdot \text{g TM}$ bestimmt. In Riboflavin-auxotrophen Mutanten der Hefen *Pichia guilliermondii* (Sibirny *et al.*, 1977) und *S. cerevisiae* (Perl *et al.*, 1976) wurden ebenfalls Riboflavin-Aufnahmesysteme beschrieben, für die kinetische Werte in ähnlichen Größenordnungen gemessen wurden. Wildtyp-Zellen beider Hefen wie auch von *A. gossypii* zeigten keine meßbare Aufnahmeaktivität. Die kinetischen Parameter der Riboflavin-Aufnahmesysteme anderer Zellen wie Oocyten von *Xenopus laevis* (Dyer und Said, 1995), Zellen von Basalmembranen der Ratte (Said *et al.*, 1993) sowie Nierenzellen von Kaninchen (Yanagawa *et al.*, 1997) sind ebenfalls der Literatur zu entnehmen, sind aber aufgrund der völlig unterschiedlichen Bezugsgrößen nur schlecht mit den kinetischen Parametern für die Riboflavinaufnahme im filamentösen Pilz *A. gossypii* vergleichbar.

Der Nachweis einer carriervermittelten Aufnahme von Riboflavin in *A. gossypii* wurde weiterhin durch Hemmstudien gestützt. Die Zugabe des Protonophors DNP führte in Übereinstimmung mit Daten für die auxotrophen Mutanten von *S. cerevisiae* (Perl *et al.*, 1976) und *P. guilliermondii* (Sibirny *et al.*, 1977) zu einer signifikanten Erniedrigung der Riboflavinaufnahme. Die meßbare Restaktivität der Riboflavinaufnahme in *A. gossypii* unter Zusatz von DNP könnte auf das Vorliegen einer weiteren Energiequelle oder auf passive Diffusion zurückzuführen sein. Neben der Energieabhängigkeit der Riboflavinaufnahme

wurde ihre Spezifität untersucht. Dies erfolgte durch die Zugabe putativer kompetitiver Inhibitoren. Während Ribose, Lumiflavin, Lumazin und Arabinoflavin keinen Effekt zeigten, führte der Zusatz der aus Riboflavin aufgebauten Cofaktoren FAD und vor allem FMN zu einer starken Hemmung der Riboflavinaufnahme. Inhibitorstudien an *S. cerevisiae* und *P. guillermondii* sowie an Zellen anderer eukaryontischer Organismen (s.o.) zeigten, daß das Spektrum für kompetitive Hemmstoffe sich bei den verschiedenen bisher charakterisierten Riboflavin-Aufnahmesystemen durchaus unterscheidet, insbesondere bezüglich der Substratanaloga Lumiflavin, Lumichrom, Lumazin und Arabinoflavin. Eine Hemmung durch Ribose konnte weder in *A. gossypii* noch für die anderen Organismen festgestellt werden (Dyer und Said, 1995; Said *et al.*, 1993; Yanagewa *et al.*, 1997). Für Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* war Abhängigkeit der Riboflavinaufnahme von Na^+ -Ionen festgestellt worden (Perl *et al.*, 1976). Weiterhin führten die Ergebnisse von Kompetitionsstudien mit verschiedenen Kohlenhydraten für die Hefen *S. cerevisiae* und *P. guillermondii* zu der Hypothese, daß dasselbe Carriersystem neben Riboflavin auch Glucose und andere Zucker transportiert (Sibirny *et al.*, 1977; Perl *et al.*, 1976). In *A. gossypii* konnte eine Abhängigkeit der Riboflavinaufnahme von Na^+ -Ionen genausowenig bestätigt werden wie ihre Beeinflussung durch verschiedene Zucker.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, daß *A. gossypii* ein spezifisches, carrier-vermitteltes Aufnahmesystem für Riboflavin besitzt, das sich durch eine relativ hohe Affinität, jedoch eine sehr geringe Aktivität auszeichnet.

Nachweis eines separaten Efflux-Carriers für Riboflavin

In der Literatur sind nur Aufnahmesysteme für Riboflavin beschrieben, die zur Versorgung von Vertebraten-Zellen oder Riboflavin-auxotrophen Hefen mit Riboflavin dienen. Riboflavin-Exportsysteme wurden bislang nicht charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Versuch unternommen, ein Riboflavin-Exportsystem bezüglich seiner kinetischen und energetischen Parameter zu beschreiben.

Für den Efflux von Riboflavin stehen drei mögliche Mechanismen zur Diskussion:

- (1) das „leak“-Modell, demzufolge der Riboflavinefflux auf einfacher Diffusion durch die Zellmembran beruhen soll;
- (2) das Inversionsmodell, wonach das Aufnahmesystem den Riboflavinefflux katalysiert, indem es unter Produktionsbedingungen in umgekehrte Richtung arbeitet;
- (3) die Katalyse über ein separates Efflux-Carriersystem.

In den Exportversuchen konnten lineare Riboflavin-Effluxkinetiken gemessen werden. Hierbei wurde von *A. gossypii* exportiertes Riboflavin extern in Mengen detektiert, die die Löslichkeitsgrenze der Substanz in Wasser (133 μM) deutlich überschreiten. Wodurch sich diese Überschreitung der Löslichkeitsgrenze ergibt, ist bislang ungeklärt.

Es wurden deutliche Unterschiede in den Exkretionsraten von Wildtyp und der stärker produzierenden Mutante ItaGS01 festgestellt. Für den Efflux wurden nach 50 h Produktion Raten von 2,5 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ beim WT und 58 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ für die Mutante ItaGS01 bestimmt, deren Exkretionsrate ins Medium ein etwa 20faches des WT ausmachte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich die Exportraten im Verlaufe der Produktion um ein Mehrfaches steigerten. In der späten Produktionsphase konnten für die Mutante ItaGS01 Exportraten von bis zu $350 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g TM}^{-1}$ bestimmt werden. Die maximalen gemessenen Exportraten der späten Produktionsphase überstiegen den V_{max} der Riboflavinaufnahme um ein 20faches. Die Daten schließen demnach eine signifikante Erniedrigung der Netto-Riboflavinexkretion durch Wiederaufnahme für die Produktion aus.

Passive Diffusion konnte anhand von Exportmessungen an Zellen, die auf 1 % (v/v) Ethanol angezogen wurden, als Mechanismus für den Riboflavinefflux ausgeschlossen werden. Die internen Riboflavinwerte dieser Zellen waren nach 50 h Produktion vergleichbar mit denen Sojaöl-gezogener Zellen, sie zeigten im Gegensatz zu diesen jedoch keinen meßbaren Riboflavinefflux. In diesen Zellen lagen damit hohe chemische Gradienten über Tonoplast (etwa 200fach, zuzüglich Riboflavinkristalle) und Plasmamembran (etwa 10fach) vor, die über die gesamte Versuchsdauer von 5 h aufrechterhalten wurden. Als Triebkraft für den Efflux ist dementsprechend der chemische Gradient von Riboflavin über die Plasmamembran allein nicht ausreichend. Der Riboflavinexport zeigte in Wachstumsversuchen auf verschiedenen C-Quellen Korrelation mit dem unterschiedlichen Energiestatus der Zellen. Der Energiestatus der Zellen wurde hierbei durch den internen ATP-Gehalt repräsentiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt der Zelle und Riboflavinexport ließ sich aber bislang nicht nachweisen, so daß der Export auch durch verschieden starke Expression oder Synthese des Exportproteins unter verschiedenen Wachstumsbedingungen reguliert sein könnte. Eine Michaelis-Menten-Analyse durch gezielte Variation der internen Riboflavinkonzentrationen kann im Falle eines Exkretionsprozesses nicht ohne weiteres durchgeführt werden. Weitere Hinweise auf einen carrier-vermittelten Export konnten nur durch Inhibitorstudien erhalten werden. Das Sulfhydrylgruppen-modifizierende Agens N-Ethylmaleimid (NEM) hemmt viele Membranproteine, u.a. Carrier des Energiestoffwechsels (Devés und Krupka, 1981a und 1981b). Die Riboflavin-Exportaktivität von *A. gossypii* wurde durch NEM stark reduziert, was einen weiteren Hinweis auf carrier-vermittelten Export lieferte. Über die Zugabe von NaCN, welches die ATP-Versorgung der Zelle über die Mitochondrien unterbricht, wurde hingegen wider Erwarten eine starke transiente Steigerung des Effluxes erzeugt, welche auf einen Zusammenbruch des Protonengradienten über die vakuoläre Membran und den resultierenden Efflux des vakuolär gespeicherten Riboflavins zurückgeführt wurde. Das Ergebnis der Inhibitorstudien mit Cyanid ließ keine weitere Aussage über den Export über die Plasmamembran zu, wurde jedoch als erster Hinweis auf die Existenz eines vakuolären Exportsystems für Riboflavin interpretiert.

Um die Hypothese der funktionellen Umkehr des Exportcarriers zu diskutieren, müssen die Resultate der Inhibition mit dem kompetitiven Inhibitor FMN betrachtet werden. Durch Zugabe des Substratanalogons FMN konnte in der frühen Produktionsphase bei noch niedrigen Exportraten eine Steigerung der Riboflavinexkretion um 30 % erzielt werden. Im späten Produktionsstadium bei viel schnellerem Export war eine Erhöhung der Exportraten nicht mehr nachweisbar. Während FMN als Kompetitor für die Riboflavinaufnahme wirkt, kann es durch zwei unterschiedliche Mechanismen zur Erhöhung der Ausscheidung führen: durch Hemmung der Konkurrenzreaktion der Riboflavinaufnahme oder durch Erhöhung der

Exkretionsgeschwindigkeit durch einen Gegen austausch-Mechanismus über einen putativen Riboflavin-Exkretionscarrier. FMN-Aufnahme in die Zelle konnte experimentell ausgeschlossen werden, wodurch ein Gegen austausch Riboflavin-FMN als Erklärung für die Beschleunigung der Riboflavinexkretion durch FMN nicht in Betracht kam. Die Erhöhung der Exkretion wurde dementsprechend auf eine Hemmung der Wiederaufnahme von Riboflavin durch die kompetitive Wirkung von FMN zurückgeführt. Die Gesamtheit der Resultate zur Riboflavinexkretion weist auf einen carriervermittelten Transport über ein separates Efflux-Carrier-System hin.

2.2. Vakuoläre Akkumulation von Riboflavin

Die Untersuchungen zum Riboflavintransport wurden insbesondere durch die vakuoläre Speicherung von erheblichen Teilen des synthetisierten Riboflavins erschwert. Sie machte zunächst das Entwickeln von zellbiologischen Methoden erforderlich, die Zugang zum vakuolären Kompartiment und seiner Hüllmembran verschafften und so eine Charakterisierung der vakuolären Riboflavin-Transportprozesse erlaubte.

Isolierung der Vakuolen

Für die Isolierung von Vakuolen aus Hefen und einigen filamentösen Pilzen sind eine Reihe von Techniken beschrieben, die auf unterschiedlichen Methoden zum Aufschluß von Protoplasten und der Abtrennung der freigesetzten Vakuolen beruhen (Bolard, 1986; Laouar *et al.*, 1992; Keenan und Weiss, 1997; Huber-Wälchli und Wiemken 1979). Im Falle von *A. gossypii* konnte eine reine Vakuolenfraktion nach mechanischem Aufschluß der Protoplasten und Abtrennen der Vakuolen aus dem Protoplastenlysat über einen Stufengradienten isoliert werden. Von 450 mg Protein im Zellrohextrakt wurden 336 mg (75 %) in der Protoplastenfraktion und 70 mg (15,5 %) im Protoplastenlysat nachgewiesen. Im nächsten Schritt wurden intakte Vakuolen über einen Stufengradienten aus dem Protoplastenlysat abgetrennt. Phasenkontrastmikroskopie zeigte eine hochreine Vakuolenfraktion, weniger als ein inakter Protoplast pro 100 Vakuolen war optisch nachzuweisen. Durch Messung cytosolischer und mitochondrieller Leitenzyme konnte zusätzlich bestätigt werden, daß die vakuoläre Fraktion frei von cytosolischen und mitochondriellen Kontaminationen war. Die Intaktheit der Vakuolen wurde durch Vitalfärbung mit Neutralrot (Peterson, 1979) und die Anreicherung der vakuolären Marker α -Mannosidase und Lysin nachgewiesen. Im Verlauf der Reinigung wurde der vakuoläre Marker α -Mannosidase 20fach, die vakuolär lokalisierte Aminosäure Lysin 14fach angereichert (Messenguy *et al.*, 1980). Die berechneten Anreicherungsfaktoren für die vakuolären Marker sind vergleichbar mit den Werten für Vakuolenpräparationen aus dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa* (Bowman und Bowman, 1982).

Selektive Permeabilisierung der Plasmamembran

Isolierte Vakuolen eignen sich zur Analyse vakuolärer Inhaltsstoffe sowie zur Präparation vakuolärer Membranen, sind aufgrund ihrer geringen mechanischen Belastbarkeit aber

ungeeignet für Transportversuche, die ihre Abtrennung aus dem Medium durch schnelle Filtration oder Zentrifugation erfordern. Für Transportmessungen am Tonoplasten sowie zur getrennten Bestimmung cytosolischer und vakuolärer Metabolit-Gehalte wurde deshalb für *A. gossypii* die Methode der selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran zur Erstellung von Vakuolen *in situ* entwickelt.

Bislang wurden Methoden zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran fast ausschließlich für Hefen etabliert. Erst kürzlich konnten Roos *et al.* (1997) eine Methode zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran des filamentösen Pilzes *Penicillium cyclopium* erarbeiten, die auf der Bildung von Porenkomplexen zwischen dem verwendeten Polyen-Antibiotikum Nystatin und Ergosterol beruht (Karst und Jund, 1976). In diesem Fall basiert die Selektivität der Porenbildung auf dem signifikant höheren Sterolgehalt (hauptsächlich Ergosterol) in der Plasmamembran von Pilzen gegenüber der vakuolären Membran (Zinser *et al.*, 1991). Im Falle von *A. gossypii* führte die Anwendung von Nystatin nicht zu einer meßbaren Permeabilisierung der Plasmamembran.

Das Saponin Digitonin bildet stöchiometrisch Porenkomplexe mit dem Sterol Cholesterin, das eine Hauptkomponente eukaryontischer Membranen ausmacht, in Pilzen aber in der Regel durch das Mykosterol Ergosterol ersetzt ist (Okros, 1968). Die Anwendung von Digitonin führte zu einer erfolgreichen Permeabilisierung der Plasmamembran von *A. gossypii*. Die zur selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran nötige Digitonin-Konzentration wurde eingestellt, indem zunächst lichtmikroskopisch die Intaktheit der Vakuolen überprüft wurde. Danach wurde eine Feineinstellung vorgenommen, indem der Austritt cytosolischer Aminosäuren ins Permeabilisierungsfiltrat gemessen und die Protonendurchlässigkeit des Tonoplasten fluoreszenzmikroskopisch über die Akkumulation von Acridin Orange überprüft wurde.

Aufgrund der unterschiedlichen Komplexbildungseigenschaften der beiden Permeabilisierungs-Agenzien Nystatin und Digitonin, die sich deutlich in ihrer Effektivität hinsichtlich der Membranpermeabilisierung in *A. gossypii* unterschieden, wurde auf einen außergewöhnlich niedrigen Ergosterolgehalt in der Plasmamembran von *A. gossypii* im Vergleich zu anderen Pilzen geschlossen. Das Habitat von *A. gossypii* sind Kulturpflanzen subtropischer Lebensräume. Der offenbar niedrige Ergosterol-Gehalt in der Plasmamembran von *A. gossypii* läßt sich eventuell mit Erkenntnissen aus der Pflanzenphysiologie erklären: Pflanzen reagieren auf Schädlingsbefall nach dem Erkennen eines sogenannten *Elicitor*-Stoffes mit Defensiv-Maßnahmen (Anderson *et al.*, 1991; Pugin und Guern, 1996). Ergosterol macht in der Regel den Hauptanteil der Steroide in der Plasmamembran von Pilzen und Hefen aus (Zinser *et al.*, 1991) und stellt einen effektiven *Elicitor* dar. Es wäre deshalb denkbar, daß *A. gossypii* einen reduzierten Ergosterolgehalt in der Membran enthält, um pflanzliche Defensivmechanismen zu unterwandern.

Aufreinigung der V-ATPase über einen Glyzerin-Dichtegradienten

Die vakuoläre H⁺-ATPase aus *A. gossypii* wurde aus vakuolären Membranen aufgereinigt, ihre Hydrolyseaktivität bestimmt und die Sensitivität des Enzyms gegenüber dem Inhibitor Concanamycin A (Dröse *et al.*, 1993) getestet.

Die Aufreinigung der V-ATPase aus vakuolären Membranen von *A. gossypii* erfolgte über einen Glycerin-Dichtegradienten. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen zeigte einen Komplex von sieben Polypeptiden in der Hauptfraktion der ATP-Hydrolyseaktivität. Dieser Proteinkomplex beinhaltete Polypeptide der apparenten molekularen Massen 68, 60, 50, 42, 35, 32 und 28 kDa. Die im gelelektrophoretischen Muster prominenten Banden bei 68 kDa und 60 kDa stellen vermutlich die beiden Untereinheiten A und B des Enzyms dar, die für andere V-ATPasen als katalytische und regulatorische Hauptkomponenten identifiziert wurden (Finbow und Harrison, 1997). Die membranverankerten Untereinheiten c und Vph1p aus *A. gossypii* konnten wie im Falle von *N. crassa* und *Sulfolobus* nicht isoliert werden. In Tab. 18 wird die Untereinheiten-Zusammensetzung der V-ATPase von *A. gossypii* mit der anderer Organismen verglichen.

Tab. 18: Vergleich der Untereinheiten-Zusammensetzung verschiedener V-Typ-ATPasen

Herkunft	Molekulare Massen der Untereinheiten (kDa)	Referenz
<i>A. gossypii</i> Vakuole	68,60,50,42,35,32,28	diese Arbeit
<i>S. cerevisiae</i> Vakuole	100,69,60, 42,36,32,27, 17	Kane <i>et al.</i> (1989)
<i>N. crassa</i> Vakuole	70,62, 39, 29,27	Bowman <i>et al.</i> (1986)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (Plasmamembran-ATPase)	69,54, 28	Denda <i>et al.</i> (1988)
Rübe Vakuole	67,57, 15	Manolson <i>et al.</i> (1985)
Weizen Vakuole	72,60, 41, 16,13	Randall und Sze (1986)
Mais Vakuole	70,62, 15	Mandala und Taiz (1986)
Rind, <i>clathrin coated vesicles</i>	100,73,58,40,38,34,33,19, 17	Xie und Stone (1986)

Wie in *A. gossypii* konnte auch für fast alle anderen V-ATPasen nur eine partielle Aufreinigung erreicht werden. Die vollständige Untereinheiten-Zusammensetzung der V-Typ ATPase konnte nur durch molekularbiologische Ansätze am Modellorganismus *S. cerevisiae* aufgeklärt werden (Finbow und Harrison, 1997): A (68 kDa); B (60 kDa); VMA13-Genprodukt (54 kDa), C (42 kDa), VMA6-Genprodukt (36 kDa), D (32 kDa), E (27 kDa), c (17 kDa), F (14 kDa), G (13 kDa) sowie das 100 kDa Genprodukt von *VPH1*. In allen oben aufgeführten Organismen konnten die beiden etwa 70 kDa- und 60 kDa-Hauptkomponenten A und B isoliert und gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Tab. 18). Die restlichen detektierbaren Untereinheiten sind in den meisten Isolierungen unvollständig, ihre Anzahl und apparente molekulare Masse unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Organismen, und ihre Funktion ist teilweise noch ungeklärt (Finbow und Harrison, 1997). Die Schwankungen in Zusammensetzung und Größe der Untereinheiten könnten ihren Grund in experimentellen Schwierigkeiten haben. Beispielsweise könnten sie sich auf die relativ kleinen Proteinmengen, die gewöhnlich bei einer Präparation vakuolärer Membranen erhalten werden (Kane *et al.*, 1989), gründen, oder auf unterschiedliche Anfälligkeit der Proteine für Proteolyse, unterschiedliches Färbeverhalten oder aber ist auf

tatsächliche Differenzen in der organell- oder gewebespezifischen Ausstattung mit diesem Enzym zurückzuführen.

Die gemessene Hydrolyseaktivität des gereinigten Enzyms aus *A. gossypii* entspricht der Hydrolyseaktivität gereinigter V-ATPase aus der verwandten Hefe *S. cerevisiae*. Die für die katalytische Aktivität erforderlichen löslichen Untereinheiten des V_1 -Sektors wurden offensichtlich vollständig isoliert. Im Gegensatz dazu fehlen die zum Membranteil V_o gehörenden Untereinheiten c (17 kDa) (Proteolipid) und Vph1p (100 kDa). Für *N. crassa* wurde eine andere Prozedur etabliert, die auf der Solubilisierung der vakuolären Membranproteine mit Triton-X 100 und einer nachfolgenden Auftrennung der Proteine über einen Saccharose-Dichtegradienten basiert (Bowman *et al.*, 1986). Für das gereinigte Enzym aus *N. crassa* wurde eine spezifische Aktivität bestimmt, die ein Mehrfaches der von *S. cerevisiae* und *A. gossypii* beträgt. Triton X-100 solubilisierte die vakuolären Membranproteine von *A. gossypii* ebenfalls gut, jedoch führte diese Behandlung zum vollständigen Verlust der ATPase-Aktivität.

In der Fraktion mit der höchsten Hydrolyseaktivität wurde die Sensitivität des Enzyms gegenüber dem spezifischen Inhibitor Concanamycin A (CCA) (Dröse *et al.*, 1993) auch für *A. gossypii* bestätigt. Die für eine halbmaximale Inhibition der V-ATPase von *A. gossypii* erforderliche Konzentration entspricht dem an *S. cerevisiae* bestimmten IC_{50} -Wert (Kane *et al.*, 1989). Für die Inhibitionsstudien an ganzen und permeabilisierten Zellen wurde in dieser Arbeit zur vollständigen Hemmung der V-ATPase von *A. gossypii* ein 5facher Überschuß an CCA (5 μ M) eingesetzt, da Adhäsion an die Zellwand des Pilzes einkalkuliert werden mußte.

Abhängigkeit der vakuolären Aminosäure- und Riboflavinspeicherung von der Aktivität der V-ATPase

Die Vakuole ist maßgeblich für die intrazelluläre Kompartimentierung von Stoffwechselreaktionen und -bestandteilen in Pilzen und Hefen. Die biochemischen Grundlagen der vakuolären Metabolitspeicherung in *A. gossypii* wurden anhand derjenigen von Aminosäuren und Riboflavin charakterisiert.

Die intrazelluläre Lokalisierung der Aminosäuren Glycin, Lysin und Arginin in *A. gossypii* ist wie bei *S. cerevisiae* (Messenguy *et al.*, 1980) hauptsächlich vakuolär. Wachstumsversuche in Gegenwart von CCA zeigten, daß Inhibition der V-ATPase mit CCA die vakuoläre Akkumulation dieser Aminosäuren signifikant verringert: über die Digitonin-Fraktionierung wurde eine Umlenkung von 80 % des vakuolären Glycins, von 94 % des vakuolären Lysins und des gesamten Bestandes an vakuolärem Arginin ins umgebende Medium gemessen. Auch die vakuoläre Akkumulation von Riboflavin in *A. gossypii* konnte durch Hemmstudien mit CCA auf die Aktivität der V-ATPase zurückgeführt werden. Unter CCA-Hemmung sezernierten die Zellen 95 % des sonst in der Vakuole gespeicherten Riboflavins ins Kulturmedium.

Vakuolärer Riboflavintransport

Aufnahmeprozesse über die vakuoläre Membran von filamentösen Pilzen sind für bestimmte Aminosäuren in *N. crassa* (Drainas und Weiss, 1982; Keenan und Weiss, 1997), *S. cerevisiae* (Boller *et al.*, 1975) und *P. cyclopium* beschrieben (Roos, 1997). Es sind durchweg Carrier-vermittelte Transporte, die die protonenmotorische Kraft, erzeugt durch die Aktivität der V-ATPase, als Triebkraft für die Akkumulation nutzen. Auch für die Riboflavinaufnahme über den Tonoplasten in *A. gossypii* konnte ein solcher sekundärer Transportprozess nachgewiesen werden. Die Aufnahme von Riboflavin und von Aminosäuren in die Vakuole konnte hierbei nicht über die Aufnahme ¹⁴C-markierter Substrate in permeabilisierte Hyphen von *A. gossypii* charakterisiert werden, sondern mußte durch Wachstums- und Kompartimentierungsstudien in Gegenwart des V-ATPase-Inhibitors CCA analysiert werden. Auch die Zugabe von ATP zum Versuchsansatz führte nicht zu meßbaren Aufnahmeaktivitäten. Eine denkbare Erklärung ist, daß für akkumulierende Transportprozesse wichtige cytosolische Funktionen durch die Digitonin-Behandlung beeinträchtigt werden.

Der durch Cyanid erzeugte Efflux des vakuolär gespeicherten Riboflavins hatte schon im Vorfeld auf die Existenz eines vakuolären Exportsystems für Riboflavin in *A. gossypii* hingewiesen. Riboflavinefflux über den Tonoplasten war im Gegensatz zum Aufnahmeprozess über Transportmessungen gut erfaßbar. Wie für den Export aus intakten Zellen waren lineare Effluxkinetiken über den Tonoplasten meßbar. Die Raten entsprachen hierbei den für intakte Zellen bestimmten Exportraten. Dies scheint auf die Tatsache hinzuweisen, daß der Riboflavinexport intakter Zellen aus dem vakuolären Reservoir gespeist wird, indem im Verlaufe des Produktionsstadiums vakuolär gespeichertes Riboflavin teilweise wieder mobilisiert wird. Eine Steigerung des Efflux durch Hemmung der Gegenreaktion der Aufnahme mit CCA oder durch Energetisieren der permeabilisierten Zellen mit ATP konnte nicht detektiert werden. Der Export wird offenbar nur über die Konzentrationsdifferenz von Riboflavin über den Tonoplasten angetrieben. Ein entsprechendes Ergebnis konnte auch für den Efflux von Arginin aus Vakuolen von *N. crassa* gezeigt werden (Drainas und Weiss, 1982). Die genauen physiologischen Voraussetzungen für die Mobilisierung vakuolärer Pools konnten aber auch in diesem Falle noch nicht geklärt werden. Vakuoläre Riboflavinaufnahme und -efflux in *A. gossypii* lassen sich nur in unterschiedlichen Zeitfenstern der Produktionsphase messen, wobei die Aufnahme qualitativ über Fluoreszenzmikroskopie erfaßt werden konnte (s.o.). Dies könnte ein Hinweis auf einen einzigen reversiblen Riboflavin-Carrier in der vakuolären Membran sein, der abhängig von der Produktionsphase Aufnahme und Efflux katalysiert und so zur Regulation des cytosolischen Riboflavingehalts beiträgt.

Über die Kultivierungsdauer konnte ein konstantes Verhältnis zwischen cytosolischem und vakuolärem Riboflavingehalt ermittelt werden. Es besteht offenbar ein dynamisches Gleichgewicht von Riboflavin mit aktiver, ATPase-abhängiger Aufnahme und Energie-unabhängigem Efflux zwischen cytosolischem und vakuolärem Kompartiment. Vergleichbar regulierte Transportsysteme sind für die vakuoläre Aminosäurespeicherung in den filamentösen Pilzen *P. cyclopium* (Roos *et al.*, 1997) und *N. crassa* (Zerez *et al.*, 1986; Keenan und Weiss, 1997) beschrieben.

2.3. Disruption des *VMA1*-Gens und resultierende Stoff-Flußumlenkung von Riboflavin in *A. gossypii*

Anhand von Inhibitionsstudien mit CCA wurde die Abhängigkeit der vakuolären Riboflavin-Akkumulation von der Aktivität der V-ATPase in *A. gossypii* nachgewiesen. Disruption des für die katalytische Untereinheit A der V-ATPase kodierenden Gens *AgVMA1* erzeugte neue Stämme, die die Fähigkeit zur vakuolären Riboflavinspeicherung verloren hatten.

Bei *S. cerevisiae* ist bei Deletion von *VMA*-Genen ein charakteristischer, von den Wachstumsbedingungen abhängig letaler *vma*⁻-Phänotyp zu beobachten. *S. cerevisiae* kann nur unter sauren Wachstumsbedingungen die verlorene Funktion der V-ATPase teilweise durch zellbiologisch gut charakterisierte Endozytosemechanismen ersetzen (Riezman, 1985), die ihr ein Ansäuern der Vakuole zur Aufrechterhaltung metabolisch wichtiger Funktionen ermöglichen. *VMA*-Deletionsmutanten anderer Pilze konnten bisher nicht isoliert werden. Die *VMA1*-Disruptanten von *A. gossypii* sind die ersten uneingeschränkt lebensfähigen *VMA1*-Disruptanten, die für Pilze isoliert werden konnten. Sie zeigen den bei *S. cerevisiae* beobachteten *vma*⁻-Phänotyp nicht.

Verschiedene im weiteren dargelegte Aspekte belegen, daß durch das isolierte Gen *AgVMA1* die Untereinheit A der V-ATPase von *A. gossypii* kodiert wird. Die molekulare Masse der putativen A-Untereinheit wurde zu 68 kDa berechnet, was der Größe bekannter Vma1-Proteine entspricht (Finbow und Harrison, 1997) und gut mit der gelelektrophoretisch zu 68 kDa bestimmten Masse der A-Untereinheit im aufgereinigten Enzym übereinstimmt. Die von *AgVMA1* abgeleitete Aminosäuresequenz ist zu den katalytischen Untereinheiten der V-ATPasen anderer Pilze und Hefen sehr ähnlich. Wie der phylogenetische Stammbaum verdeutlicht, sind die Vma1-Proteine von *A. gossypii* und *S. cerevisiae* sehr nah miteinander verwandt, während die Proteine NcVma1p und AgVma1p der beiden filamentösen Spezies *A. gossypii* und *N. crassa* weiter voneinander entfernt sind. Auch die Ähnlichkeit zwischen den beiden Hefeproteinen ScVma1p und CtVma1p ist deutlich geringer. Das Dendrogramm der Vma1-Proteine ist damit ein weiterer Beleg für die enge Verwandtschaft von *S. cerevisiae* und *A. gossypii* und unterstützt die von Prillinger *et al.* (1997) vorgenommene Klassifizierung der beiden Organismen in die Familie der Saccharomycetaceae. Es wurde ebenfalls signifikante Ähnlichkeit von AgVma1p zu den β -Untereinheiten von F_0F_1 -ATPasen verschiedener Hefen festgestellt. Die Ähnlichkeit zu anderen Vma1-Proteinen zeigte sich im einzelnen an folgenden Sequenzmotiven: die Untereinheit A der V-ATPase von *A. gossypii* enthält das ausnahmslos in allen bekannten Vma1-Proteinen stark konservierte ATP-Bindemotiv (P-Loop), das nach bisherigen Erkenntnissen am katalytischen Prozess der ATP-Hydrolyse beteiligt ist (Uchida *et al.*, 1988). Genetische und biochemische Studien an Vma1p von *S. cerevisiae* zeigten, daß einige Aminosäurereste essentiell für die Enzym-Zusammenlagerung bzw. für seine katalytische Aktivität sind. Solche Aminosäuren sind auch in der Sequenz von AgVma1p konserviert. Trotz der hohen Ähnlichkeit des von *AgVMA1* abgeleiteten Polypeptids AgVma1p zu ScVma1p und CtVma1p kodiert die Nukleotidsequenz von *AgVMA1* nicht für ein Intein, wie es in den Vma1-Propeptiden von *S. cerevisiae* (Chong *et al.*, 1996) und *C. tropicalis* (Gu *et al.*, 1993) auftritt. Dieses in seiner Funktion noch nicht

verstandene Intein spaltet sich posttranslational aus dem Vma1-Propeptid heraus (Chong *et al.*, 1996). Im reifen Protein ist es nicht mehr nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu *S. cerevisiae* die Aktivität der V-ATPase nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von *A. gossypii* ist. Die Zelle kann sich physiologisch an den Verlust des vakuolären Speicherkompartiments adaptieren. Die vakuoläre Akkumulation von Aminosäuren und Riboflavin (s.u.) wird in den Disruptanten von *A. gossypii* durch Exkretion ins Medium ersetzt. Die Analyse der intrazellulären Lokalisation der Aminosäuren Glycin, Lysin und Arginin hatte im Wildtyp eine prädominant vakuoläre Verteilung ergeben, wie sie schon für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Messenguy *et al.*, 1980). Der Verlust des vakuolären Speicherkompartiments durch die *VMA1*-Disruption führt in *A. gossypii* zur Exkretion vakuolärer Metabolite, um die cytosolischen Konzentrationen dieser Aminosäuren konstant niedrig halten zu können. Im Falle erhöhter metabolischer Bedürfnisse muß allerdings in den Disruptanten für die *de novo*-Synthese ein höherer Energieaufwand geleistet werden als es für die Mobilisierung vakuolärer Speicher nötig wäre. Dies könnte zur Verzögerung des Wachstums beitragen. Es muß angenommen werden, daß auch die Ablagerung toxischer Substanzen in die Vakuole und die Ca^{2+} -Homöostase in *A. gossypii* durch den Austausch vakuolärer und cytoplasmatischer Pools in den Disruptanten durch Exkretion ins Medium ersetzt wird. Die bei weitem am besten charakterisierte physiologische Rolle der Vakuole ist der Umsatz von Proteinen. Die Vakuole enthält eine große Zahl membrangebundener und löslicher Hydrolasen (van den Hazel *et al.*, 1996). Diese Proteine werden durch Transportvesikel-vermittelte Sortiervorgänge über die Komponenten des zentralvakuolären Systems in die Vakuole sezerniert (Nothwehr und Stevens, 1994; Stack *et al.*, 1995). Die Vakuole stellt dabei selbst einen integralen Bestandteil dieses dynamischen Endomembransystems dar. Die Endomembransysteme des zentralvakuolären Systems werden über die Aktivität der V-ATPase energetisiert (Finbow und Harrison, 1997), so daß *VMA*-Disruptionen negative Effekte auf das Proteinsorting erzeugen. Für eine Reihe von Proteinen ist allerdings bekannt, daß sie auch über einen alternativen Sortiervorgang in die Vakuole gelangen können, der nicht über das Endosom verläuft (Horazdovsky *et al.*, 1996). Dies könnte auch ein Weg für die Adaptation der *VMA1*-Disruptanten von *A. gossypii* sein. Diese Überlegung wird insbesondere durch die Tatsache gestützt, daß in vakuolären Membranpräparationen der *VMA1*-Disruptanten von *A. gossypii* dem Wildtyp vergleichbare Aktivität der α -Mannosidase, einer Tonoplasten-ständigen Hydrolase, nachweisbar war. Bisher ist allerdings nicht gezeigt, daß lytische Enzyme, insbesondere Proteasen, unter neutralen pH-Bedingungen, wie sie ohne Aktivität der V-ATPase in der Vakuole von *A. gossypii* vorliegen, aktiv sind.

Die generative Vermehrung durch Sporulation zeigte in den *VMA1*-Disruptanten die deutlichste Einschränkung normaler Zellfunktionen. Obwohl die Disruptanten nahezu uneingeschränkt wachstumsfähig waren, konnte unter keinen Bedingungen Sporulation beobachtet werden. Aus aktuellen Untersuchungen an *S. cerevisiae* ist bekannt, daß der Vorgang der Sporulation die Bildung einer Prosporen-Membran erfordert (Neimann, 1998). Die Synthese dieser Membran findet im Trans-Golgi-Netzwerk des zentralvakuolären Systems statt (Neimann, 1998). Der Verlust der Sporulationsfähigkeit der *AgVMA1*-

Disruptanten ist damit mit einem - zumindest gestörten - Verlauf des Substanzflusses zur Proteinsekretion in die Vakuole zu erklären.

Durch die Disruption des *VMA1*-Gens konnte die unter CCA-Hemmung bereits beobachtete Umlenkung vakuolär lokalisierten Riboflavins in neukonstruierten Stämmen umgesetzt werden. Dieser Umlenkungseffekt wurde bereits am Modellsystem der vakuolären Aminosäurespeicherung diskutiert. Die Stoff-Flußumlenkung vakuolärer Metabolite bestätigte sich unter CCA-Hemmung und in den Disruptanten auch für Riboflavin. In den Ausgangsstämmen ist eine signifikante Akkumulation der synthetisierten Riboflavins im vakuolären Speicherkompartiment meßbar (s.o.). Dies macht einen Zellaufschluß zur Gewinnung der Gesamtmenge an produziertem Vitamin B₂ erforderlich. Mit den in dieser Arbeit konstruierten Disruptanten konnte nach hinreichender Adaptation gleiche Produktivität bei vollständiger Exkretion des synthetisierten Riboflavins ins Kulturmedium erreicht werden. Mit den Disruptanten der Mutanten ItaGS01 und A27 wurden damit neue Produzentenstämmen mit effektiver Stoff-Flußumlenkung ins Kulturmedium konstruiert.

Der Riboflavinexport der Disruptanten ist im C-Quelle-freien Puffer deutlich niedriger als der der Ausgangsstämme. Dies ist bemerkenswert, da vergleichbare Produktivität nachgewiesen werden konnte. Die meßbaren Exportraten nehmen im Gegensatz zu denen der Ausgangsstämme im Laufe der Kultivierungsdauer ab. Dies kann als erhöhter Energiebedarf der Disruptantenzellen für den Export oder für die durch die Disruption nötigen physiologischen Adaptationsvorgänge interpretiert werden.

In den *VMA1*-Disruptanten liegt nur noch Riboflavintransport über die Plasmamembran vor, Riboflavinflüsse über den Tonoplasten finden nicht mehr statt. Mit diesen Zellen steht damit ein System für das *Screening* nach dem Plasmamembran-ständigen Riboflavinexporter zur Verfügung. Durch Überexpression dieses Exportsystems könnte künftig eine weitere Verbesserung der Produktion erzielt werden.

3. 2-D-Gelelektrophorese zum Screening auf den vakuolären Riboflavin-transporter von *A. gossypii*

Durch Disruption des für die A-Untereinheit der V-ATPase kodierenden Gens konnte zwar eine Umlenkung der Riboflavin-Flüsse erreicht werden, jedoch war durch die Auswirkungen der Disruption eine längere Adaptationsphase für vergleichbare Produktivität nötig. Eine Alternative zur Disruption eines *VMA*-Gens könnte die Deletion des für den vakuolären Riboflavinaufnahme-Carrier kodierenden Gens darstellen. Es steht kein einfaches *Screening*-System zur Isolierung dieses vakuolären Riboflavintransporters zur Verfügung. Über UV-Sporenmutagenese erhaltene Defektmutanten in der vakuolären Riboflavinaufnahme können nicht von Mutanten mit verringerter Biosynthese unterschieden werden, die eine vakuoläre Riboflavinspeicherung nicht erforderlich macht. Zur Isolierung des vakuolären Exportcarriers für Riboflavin erschien daher ein Ansatz über Vergleich der Proteinmuster vakuolärer Membranen von nicht-akkumulierenden Zellen (*VMA1*-Disruptanten), schwach-akkumulierenden Zellen (Wildtyp) und stark-akkumulierenden Zellen

IV. DISKUSSION

(ItaGS01) erfolgsversprechend. Grundsätzlich ist hierfür die 2-D-PAGE in Kombination mit der Proteomanalyse eine leistungsfähige Technik, bei der auch komplexe Proteinmuster aufgelöst werden können (Dunn und Burghes, 1983; Klose und Kobalz, 1995).

Ziel dieses Abschnittes der Arbeit war es, die Analyse vakuolärer Membranproteine über 2-D-PAGE zur Identifizierung des vakuolären Riboflavin-Exportsystems zu etablieren. Dazu mußten die entsprechenden Methoden der 2-D-PAGE, insbesondere eine geeignete Solubilisierungstechnik der vakuolären Membranproteine, für *A. gossypii* erarbeitet werden. Die 2-D-Gelelektrophorese der vakuolären Membranproteine von *A. gossypii* ergab gut aufgelöste reproduzierbare Proteinmuster. Die Proteinmuster der V-Membranen von Wildtyp, V-ATPase-Disruptante und Riboflavin-Überproduzent wurden verglichen, die Auswertung wies auf wenigstens 2 Proteinspots unterschiedlicher Intensität zwischen den Stämmen hin. Dabei schien die unterschiedliche Intensität der Proteinspots mit der Stärke der vakuolären Akkumulation von Riboflavin in diesen Stämmen zu korreliert zu sein. Die noch ausstehende Ansequenzierung dieser Spots muß zeigen, ob einer der detektierten Spots typische Struktur motive eines vakuolären Transportproteins aufweist. Dieser Ansatz könnte evtl. noch durch Vergleich der Proteinmuster von Wildstamm und industriellem Produktionsstamm (BASF AG) erweitert werden.

Die geplante Deletion des für den vakuolären Riboflavinexporter kodierenden Gens stellt nur eine von verschiedenen Möglichkeiten dar, die Riboflavinproduktion in *A. gossypii* durch gezielte Manipulation der vorliegenden Transportprozesse zu optimieren. Grundlegend hierfür ist die in dieser Arbeit erbrachte Charakterisierung der vorliegenden carrier-vermittelten Transportprozesse für Riboflavin in *A. gossypii* (Abb. 47). Hierbei wurden die Transportprozesse über Plasmamembran und Tonoplast getrennt analysiert. Als entscheidende Faktoren für die Produktion stellten sich der Export über die Plasmamembran sowie die Riboflavinaufnahme in das vakuoläre Speicherkompartiment heraus (Abb. 47). Eine Strategie für die Umlenkung vakuolärer Riboflavinflüsse konnte in dieser Arbeit durch Disruption des *VMA1*-Gens, das für die A-Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase kodiert, bereits realisiert werden. Mithilfe der *VMA1*-Disruptanten wurde außerdem die Grundlage für eine gezielte Verbesserung der Exkretion geschaffen, die auf Isolierung und Überexpression des Plasmamembran-ständigen Exportsystems beruhen könnte.

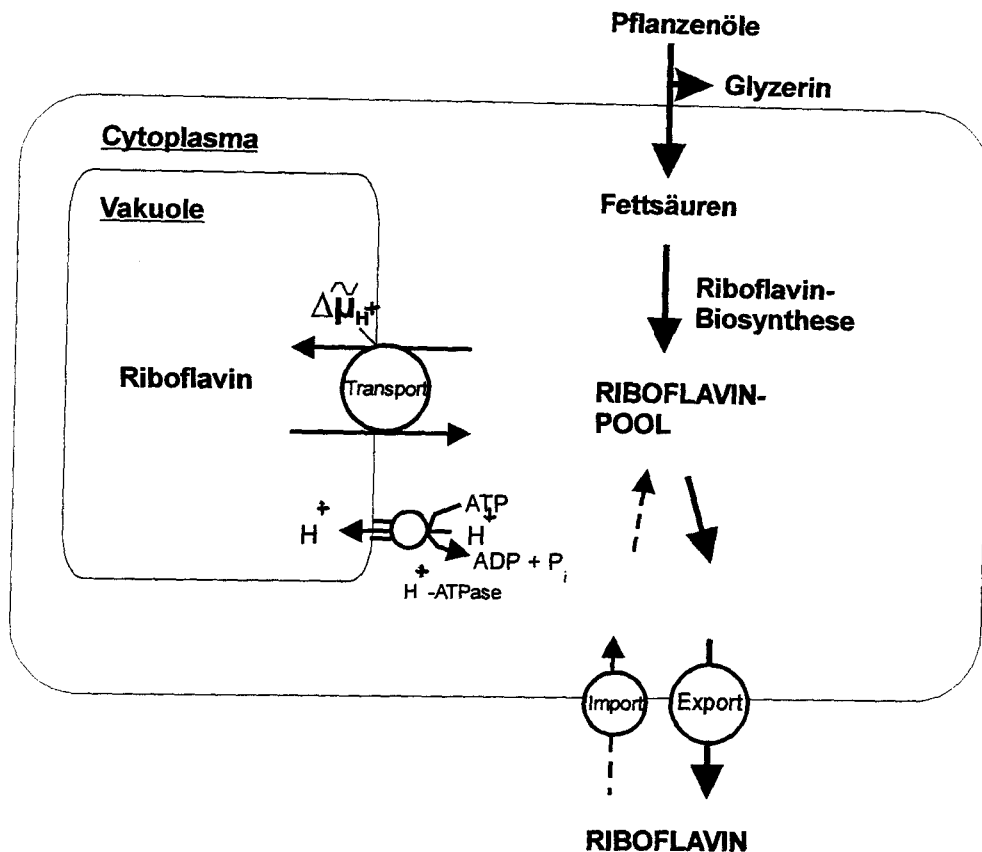


Abb. 47: Modell für Stoff-Flüsse von Riboflavin in *A. gossypii*. Riboflavinaufnahme aus dem Medium ist lediglich in auxotrophen Mutanten von *A. gossypii* nachweisbar. Die Aufnahme ist carriervermittelt und wird über ein System hoher Affinität doch sehr niedriger Aktivität geleistet. Der Exportcarrier katalysiert den Efflux von Riboflavin im Wildstamm und in Mutanten mit deregulierter Riboflavin-Biosynthese und weist bis zu 20fach höhere Aktivität als der Aufnahmecarrier auf. In den Vakuolen der Zellen wird ein signifikanter Anteil des gebildeten Riboflavins gespeichert. Der vakuoläre Riboflavinpool steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem cytosolischen Pool und wird über die cytosolische Riboflavin-Konzentration reguliert. Aufnahme und Efflux an der vakuolären Membran werden wahrscheinlich über ein- und dasselbe reversible Transportprotein vermittelt. In den im Rahmen dieser Arbeit konstruierten *VMA1*-Disruptanten findet keine vakuoläre Retention von Riboflavin statt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der filamentöse Pilz *A. gossypii* wird zur biotechnologischen Riboflavinproduktion eingesetzt. Ziel dieser Arbeit war es, die vorliegenden Riboflavin-Transportprozesse und die Adaptationsmechanismen an hyperosmotischen Streß zu charakterisieren und die Ergebnisse zur Konstruktion von Mutanten mit verbesserter Riboflavinexkretion zu nutzen.

Während der biotechnologischen Produktion von Riboflavin kann es zu hyperosmotischem Streß kommen, der die Riboflavinexkretion erniedrigt. Daher ist die Erforschung der vorliegenden Adaptationsmechanismen von wirtschaftlichem Interesse. *A. gossypii* zeichnet sich durch hohe Osmotoleranz, aber geringe Halotoleranz aus. Der Pilz adaptiert an hyperosmotischen Streß durch die Akkumulation von Polyolen, hauptsächlich von Glycerin. Glycerin wird über Biosynthese zur Verfügung gestellt, das Glycerin-Aufnahmesystem wird zum Schutz gegen Verluste durch funktionelle Umkehr des Carriers unter dem Druck des auswärts gerichteten Glyzeringradienten in seiner Aktivität herunterreguliert.

Die Riboflavinaufnahme über die Plasmamembran wurde als carrier-vermittelter Transportprozess hoher Affinität aber niedriger Aktivität charakterisiert. Der Export wird über ein separates Carrier-System vermittelt. Die Exportraten steigern sich im Verlaufe der Produktion um ein Mehrfaches und betragen in der späten Produktionsphase etwa das 20fache der gemessenen Aufnahmeraten. Wiederaufnahme des sezernierten Riboflavins in die Zelle ist im Vergleich zum Export für die Netto-Exkretion vernachlässigbar. Für die Analyse der vakuolären Riboflavinspeicherung wurden zellbiologische Techniken entwickelt, die Zugang zum vakuolären Kompartiment verschafften. Hierfür wurden Methoden zur Isolierung der Organellen und zur Erstellung von Vakuolen *in situ* durch selektive Permeabilisierung der Plasmamembran etabliert. Außerdem wurde eine Methode zur Aufreinigung der vakuolären H⁺-ATPase entwickelt, um ihre Aktivität und Inhibitorsensitivität zu charakterisieren. Über Kompartimentierungssudien und kinetische Analyse der vorliegenden Riboflavinflüsse an der vakuolären Membran konnte ein dynamisches Gleichgewicht von Riboflavin zwischen Cytosol und Vakuole nachgewiesen werden. Dieses Gleichgewicht wird nach metabolischen Bedürfnissen durch aktive, ATPase-abhängige Aufnahme und energieunabhängigen Efflux von Riboflavin reguliert. Unter Inhibition der V-ATPase mit dem spezifischen Inhibitor Concanamycin A konnte eine Umlenkung der vakuolären Riboflavinflüsse ins Kulturmedium erreicht werden. Durch Erzeugen einer V-ATPase-Defektmutante wurden neue Stämme mit dieser Eigenschaft erhalten. Die Inaktivierung der V-ATPase erzeugte einen bisher bei Pilzen nicht beschriebenen Phänotyp, der trotz dysfunktionaler Vakuole uneingeschränkt lebensfähig ist. Die *VMA1*-Disruptanten weisen weiterhin signifikante Riboflavinflüsse nur über die Plasmamembran auf. Sie können damit geeignet sein, den Plasmamembran-ständigen Riboflavinexporter zu isolieren, um ihn zur weiteren Verbesserung der Produktion überzuexprimieren. Als Grundlage für einen alternativen Ansatz, dessen Ziel die Umlenkung der Riboflavinflüsse durch Deletion des vakuolären Riboflavinexporters ist, wurde als Screening-System die 2-dimensionale Gelelektrophorese vakuolärer Membranproteine etabliert.

VI. Literatur

- Adler, L., Blomberg, A. und Nilsson, A. (1985)** Glycerol Metabolism and Osmoregulation in the Salt Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. **162**: 300-306
- Altmann-Jöhl, R. und Philippsen, P. (1996)** *AgTHR4*, a new selection marker for transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*, maps four-gene cluster that is conserved between *A. gossypii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **250**: 69-80
- Anderson, A.J., Rogers, K., Tepper, C.S., Blee, K. und Cardon, J. (1991)** Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells. Physiol. Mol. Plant Pathol. **38**: 1-13
- André, L., Nilsson, A. und Adler, L. (1988)** The Role of Glycerol in Osmotolerance of the Yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Gen. Microbiol. **134**: 669-677
- Ashby, S.F. und Nowell, W. (1926)** The fungi of stigmatomycosis. Ann. Botany **40**: 69-84
- Atkins, R.E. und Tuan, R.S. (1992)** Measurement of protein in 20 seconds using a microwave BCA assay. Biotechniques **12**: 496-499
- Bacher, A. (1991)** Biosynthesis of flavins. In: F. Müller (Ed.) Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, vol. 1, S. 215-249. CRC Press, Boca Raton
- Barile, M., Passarella, S., Bertoldi, A. und Quagliariello, E. (1993)** Flavin adenine dinucleotide synthesis in isolated rat liver mitochondria caused by imported flavin mononucleotide. Arch. Biophys. **305**: 442-447
- Batra, L.R. (1973)** *Nematosporaceae (Hemiascomycetidae)*: Taxonomy, Pathogenicity, Distribution and Vector Relations. Technical Bulletin N. 1469 of the Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, USA
- Bauerle, C., Ho, M.N., Lindorfer, M.A. und Stevens, T.H. (1993)** The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H(+)-ATPase membrane sector. J. Biol. Chem. **268**: 12749-12757
- Beutler, E., Srivastava, S.K. und West, C. (1970)** The reversibility of N-ethylmaleimide (NEM) alkylation of red cell glutathione. Biochem. Biophys. Res. Commun. **38**: 341-7
- Bigelis, R. (1989)** Industrial products of biotechnology: Application of gene technology. In: Rehm, H.J. und Reed, G. (Eds.) Biotechnology, vol. 7b, S. 243. VHC, Weinheim
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523

- Blomberg, A. und Adler, L. (1989)** Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD^+) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **171**: 1087–1092
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J. (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8**: 93-99
- Bolard, J. (1986)** How do polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? Biochim. Biophys. Acta **864**: 257-304
- Boller, T., Durr, M. und Wiemken, A. (1975)** Characterization of a specific transport system for arginine in isolated yeast vacuoles. Eur. J. Biochem. **54**: 81-91
- Bowman, B.J., Vazquez-Laslop, N. und Bowman E.J. (1992)** The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. J. Bioenerg. Biomemb. **24**: 361- 370
- Boman, E.J., Mandala, S, Taiz, L., und Bowman, B.J. (1986)** Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 48-52
- Bowman, E.J. und Bowman, B.J. (1982)** Identification and properties of an ATPase in vacuolar membranes of *Neurospora crassa* J. Bacteriol. **151**: 1326-133
- Brenner, A.J. und Harris, E.D. (1995)** A quantitative test for copper using bicinchonic acid. Anal. Biochem. **226**: 80-84
- Brown AD (1978)** Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. In: AH Rose, JG Morris (Eds.), Advances in microbial physiology, vol. **17**. Academic Press Inc., NY, S. 181-242
- Brown, A.D. (1976)** Microbial water stress. Bacteriol. Rev. **40**: 803 - 846
- Brown, A.D. (1990)** Microbial water stress physiology, principles and perspectives. John Wiley und Sons Ltd. Chichester, UK
- Brown, A.D., Kylie, F., Mackenzie, F. und Singh, K.K. (1986)** Selected aspects of microbial osmoregulation. FEMS Microbiol. Rev. **39**: 31-36
- Brown, F.F. (1982)** [NMR studies of glycerol permeability in lipid vesicles, erythrocytes and the alga *Dunaliella*. Biochim. Biophys. Acta **690**: 165-167
- Calarhorra, M., Martinez, G.A., Hernandez-Cruz, A. und Peña, A. (1998)** Influence of Monovalent Cations on Yeast Cytoplasmic and Vacuolar pH. Yeast **14**: 501-515
- Chong, S., Shao, Y., Paulus, H., Benner, J., Perler, F.B. und Xu, M.-Q. (1996)** Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system. J. Biol. Chem. **271**: 22159-22168

- Cononico, P.G. und Bird, J.W.C. (1969)** The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **43**: 367-371
- Cooper, T.G. (1982)** Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbour Laboratory, S. 399-461
- Csonka, L.N. (1989)** Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **45**: 569-606
- Csonka, L.N. und Hanson, A.D. (1991)** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606
- Dammer, K.H. und Ravelo, H.G. (1990)** Verseuchung von *Leptoglossus gonagra* (Fabr.) mit *Nematospora coryli* Peglion und *Ashbya gossypii* (Ashby et Nowell) Giulliermond in einer Zitrusanlage der Republik Kuba. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **26**: 71-78
- Demain, A.L. (1972)** Riboflavin oversynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **26**: 369 - 388
- Denda, K., Konishi, J., Oshima, T., Date, T. und Yoshida, M. (1988)** The membrane-associated ATPase from *Sulfolobus acidocaldarius* is distantly related to F1-ATPase as assessed from the primary structure of its alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* **263**: 6012-6015
- Devés, R. und Krupka, R.M. (1981a)** Evidence for a two-state mobile carrier mechanism in erythrocyte choline transport: Effects of substrate analogs in inactivation of the carrier by N-ethylmaleimide. *J. Membr. Biol.* **61**: 21-30
- Devés, R. und Krupka, R.M. (1981b)** Reaction of internal forms of the choline carrier of erythrocytes with N-ethylmaleimide: Evidence for a carrier conformational change on complex formation. *J. Membr. Biol.* **63**: 99-103
- Drainas, C. und Weiss, R.L. (1982)** Energetics of Vacuolar Compartmentation of Arginine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **150**: 770-778
- Dröse, S., Bindseil, K.U., Bowman, E.J., Siebers, A., Zeeck, A. und Altendorf, K. (1993)** Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochem.* **32**, No. 15, 3902-3906
- Dunn, M.J. und Burghes, A.H.M. (1983)** *Electrophoresis* **4**: 97-116
- Dyer, D.L. und Said, H.M. (1995)** Riboflavin uptake by native *Xenopus laevis* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**: 15-21
- Easterby, J.S. und Qadri, S.S. (1982)** Hexokinase Type II from rat skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **90**: 11-15

- Edgley, M. und Brown, A.D. (1983)** Osmoregulation in yeast. In: Rains DW and Valentine RC (Eds): Genetic Engineering of Osmoregulation: impact on plant productivity for food, chemicals, and engineering. Plenum press, NY, S. 75-90
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983)** A technique for radiolabeling restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- Ferea, T.L. und Bowman, B.J. (1996)** The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa* is indispensable: inactivation of the *vma-1* gene by repeat-induced point mutation. *Genetics* **143**: 147-154
- Finbow M.E. und Harrison, M.A. (1997)** The vacuolar H⁺-ATPase: an universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* **324**: 697 - 712
- Fincham, J.R.S. (1989)** Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 148-170
- Forgac, M. (1989)** Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev.* **69**: 765-96
- Galinski, E.A. und Herzog, R.M. (1990)** The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Extothiorhodospira halochloris*). *Microbiol* **153**: 607-613
- Gancedo, C., Gancedo, J.M. und Sols, A. (1968)** Glycerol Metabolism in Yeasts. *Eur. J. Biochem.* **5**: 165-172
- Garcia, M.J., Ríos, G., Ali, R., Bellés, J.M. , Serrano, R. (1997)** Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* **143**: 1125-1131
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J. Manolson, M., Poole, R.J., Dae, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, K. und Yoshida, M. (1989)** Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. natl. Acad. Sci.* **14**: 6661-6665
- Goodwin, T.W. (1959)** Production and biosynthesis of riboflavin in micro-organisms. Hockenull, D.J.D. (Ed.) In: Progress in Industrial Microbiology, vol. 1, S. 139-177, London: Heywood & Company
- Görg, A. (1997)** Two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients - A laboratory manual. Zu beziehen über Pharmacia Biotech, Freiburg, D.
- Görg, A., Postel, W. und Günther, S. (1988)** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH-gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546
- Graham, L.A., Hill, K.J. und Stevens, T.H. (1994)** VMA7 encodes a novel 14-kDa subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase complex. *J. Biol. Chem.* **269**: 25974-25977

- Graham, L.A., Hill, K.J. und Stevens, T.H. (1995)** VMA8 encodes a 32-kDa V1 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H(+)-ATPase required for function and assembly of the enzyme complex. *J. Biol. Chem.* **270**: 15037 - 15044
- Graumann, P. und Marahiel, M.A. (1996)** Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* **166**: 293-300
- Gu, H.H., Gallagher, M.J.X. und Dean, G.E. (1993)** Peptide Splicing in the Vacuolar ATPase Subunit A from *Candida tropicalis*. *J. Biol. Chem.* **268**: 7372-7381
- Guilliermond, P. (1928)** Recherches sur quelques Ascomycetes inferieurs isoles de la stigmatomycose des graines de cotonnier. Essai sur la phylogenie des Ascomycetes. *Rev. Gen. Bot.* **40**: 328-342, 397-414, 474-485, 555-574, 606-624, 690-704
- Gurr, S.J., Unkles, S.E. und Kinghorn, J.R. (1987)** In: Kinghorn, J.R. (Ed.) Gene Structure in eukaryotic microbes. IRL Press, Oxford, S.93-139
- Hanh, S., Hoar, E.T. und Guarante, L. (1985)** Each of three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation sites at the CYC-1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8562-8566.
- Harold, F.M. (1986)** The vital force: a Study of Bioenergetics. W.H. Freeman and Company, New York, N.Y., USA
- Heefner, D.L., Weaver, C.A., Yarus, M.J. und Burdzinski, L.A. (1992)** Method for producing riboflavin with *Candida famata*. Patent US 5 164 303.
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J. und Fuchs, R. (1992)** CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* **8**:189-191
- Hill, K.J. und Stevens, T.H. (1994)** Vma21p is a yeast membrane protein retained in the endoplasmic reticulum by a di-lysine motif and is required for the assembly of the vacuolar H(+)-ATPase complex. *Mol. Biol. Cell* **5**: 1039-1050
- Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. und Anraku, Y. (1990)** Roles of the VMA3 gene product, subunit c of the vacuolar membrane H(+)-ATPase on vacuolar acidification and protein transport. A study with VMA3-disrupted mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 6726-6733
- Hirata, R., Umemoto, N., Ho, M.N., Ohya, Y., Stevens, T.H. und Anraku, Y. (1993)** VMA12 is essential for assembly of the vacuolar H(+)-ATPase subunits onto the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 961-967
- Ho, M.N., Hill, K.J., Lindorfer, M.A. und Stevens, T.H. (1993b)** Isolation of vacuolar membrane H(+)-ATPase-deficient yeast mutants; the VMA5 and VMA4 genes are essential for assembly and activity of the vacuolar H(+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **268**: 221-227

- Ho, M.N., Hirata, R., Umimoto, N., Ohya, Y., Takatsuki, A., Stevens, T.H. und Anraku, Y. (1993a)** VMA13 encodes a 54-kDa vacuolar H(+)-ATPase subunit required for activity but not assembly of the enzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 18286-1829
- Hocking, A.D. und Norton, R.S. (1983)** Natural-abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance studies on the internal solutes of xerophilic fungi. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2915-2925
- Horazdovsky, B.F., Cowles, C.R., Mustol, P., Holmes, M., Emr, S.D. (1996)** A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J. Biol. Chem.* **271**: 33607-33615
- Huber-Wälchli, V. und Wiemken, A. (1979)** Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-dextran. *Arch. Microbiol.* **120**: 141-149
- Jennings, D.H. (1976)** Transport in fungal cells. In: Lüttge, U. und Ptman, U.G. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology, Transport in Plants II*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, S. 189-228
- Jennings, D.H. (1983)** Some aspects of the physiology and biochemistry of marine fungi. *Biol. Rev.* **58**: 4232 - 459
- Jennings, D.H. (1995)** The physiology of fungal nutrition. Cambridge University press, Cambridge, S. 251-285
- Jones, B.M. und Gilligan, J.P. (1983)** O-Phtaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* **166**: 471-482
- Kane, P. und Stevens, T.H. (1992)** Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 383 - 393
- Kane, P.M., Kuehn, M.C., Howald-Stevenson, I., und Stevens, T.H. (1992)** Assembly and targeting of peripheral and integral membrane subunits of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 447-454
- Kane, P.M., Yamashiro, C.T. und Stevens, T.H. (1989)** Biochemical Characterization of the yeast vacuolar H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **264**: 19236-19244
- Karst, F. und Jund, R. (1976)** Sterol replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect on cellular permeability and sensitivity to nystatin. *Biochem Biophys Res Commun.* **71**: 535-543
- Keenan, K. A. und Weiss, R.L. (1997)** Characterization of vacuolar arginine uptake and amino acid efflux in *Neurospora crassa* using cupric ion to permeabilize the plasma membrane. *Fungal Genet. Biol.* **22**: 177-190

Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K. und Vogensen, F.K. (1997) Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 1826-1837

Klingenberg, M. und Pfaff, E. (1977) Means of termination reactions. Methods in Enzym. **10**: 680-684

Klionsky, D.J., Herman, P.K. und Emr, S.D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. Microbiol. Rev. **54**: 266 - 292

Klose, J. und Kobalz, U. (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis **16**: 1034-1059

Kotyk, A., und Janacek, C. (1975) Cell Membrane Transport-Principles and Techniques. Plenum Press, New York, London

Krämer, R. und Palmieri, F. (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **974**: 1-32

Kuan, J. und Saier, M.H. (1993) The Mitochondrial Carrier Family of Transport Proteins - Structural, Functional, and Evolutionary Relationships. Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. **28**: 209-233

Kurtzman, C.P. (1995) Relationship among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* determined from rDNA divergence. J. Indust. Microbiol. **14**: 523-530

Kutsal, T. und Özbas, M.T. (1989) Microbial production of vitamin B₂ (riboflavin). In: Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors. Elsevier Appl. Science, London, New York, S. 149-168

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685

Lages, F. und Lucas, C. (1995) Characterization of a glycerol/ H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. Yeast **11**: 111-119

Lago, B.D. und Kaplan, L. (1981) Vitamin fermentations: B₂ and B₁₂. Adv. Biotechnol. **3**: 241-246

Lanyi, J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriol Rev **38**: 272 - 290

Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. und Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Anal. Biochem. **100**: 95-97

- Laouar, L., Mulligan, B.J. und Lowe, K.C. (1992)** Yeast permeabilization with surfactants. *Biotechnol Lett* **14**: 719-720
- Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L. und Adler, L. (1990)** Osmoregulation of the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii* Grown in a Chemostat at Different Salinities. *J. Bacteriol.* **172**: 1769-1774
- Latterich, M. und Watson, M.D. (1993)** Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccaromyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **191**: 1111-1117
- Liu, Q. und Kane, P.M. (1996)** Mutational analysis of the catalytic subunit of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Biochemistry* **35**: 10938-10948
- Liu, Q., Leng, X-H., Newman, P.R., Vasilyeva, E., Kane, P.M. und Forgac, M. (1997)** Site-directed mutagenesis of the yeast V-ATPase A subunit. *J. Biol. Chem.* **272**: 11750-11756.
- Logvinenko, E.M., Shavlovskii, G.M. und Tsarenko, N.Y. (1984)** The role of iron in regulation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase synthesis in flavogenic yeast. *Biochemistry* **49**: 38-46
- Logvinenko, E.M., Shavlovskii, G.M. und Tsarenko, N.Y. (1985)** Proteins of the 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase system of the yeast *Pichia guillermondii* and regulation of their biosynthesis. *Biochemistry* **50**: 625-629
- Luard, E. (1982)** Growth and accumulation of solutes by *Phytophthora cinnamoni* and other lower fungi in response to changes in external osmotic potential. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2583-2590
- Lucas, C., da Costa, M. und van Uden, N. (1990)** Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**: 187-191
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. und Hohmann, S. (1995)** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* **14**: 1360-1371
- MacLeod, K.J., Vasilyeva, E., Baleja, J.D. und Forgac, M. (1998)** Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 150-156
- Mager, W.H. und Varela, J.C.S. (1993)** Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* **10**: 253-258
- Mandala, S. und Taiz, L. (1986)** Characterization of the subunit structure of the maize tonoplast ATPase. Immunological and inhibitor binding studies. *J. Biol. Chem.* **261**: 12850-12855

Manolson, M.F., Proteau, D., Preston, R. A., Stenbit, A., Roberts, B. T., Hoyt, M. A., Preuss, D., Mulholland, J., Botstein, D. und Jones, E. W. (1992a) Evidence for a conserved 95-120 kDa subunit associated with and essential for activity of V-ATPases. *J. Biol. Chem.* **267**: 14294-14303

Manolson, M.F., Proteau, D., Preston, R.A., Stenbit, A., Roberts, B.T., Hoyt, M.A., Preuss, D., Mulholland, J., Botstein, D. und Jones, E.W. (1992b) The *VPH1* gene encodes a 95-kDa integral membrane polypeptide required for in vivo assembly and activity of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 1424-14303

Manolson, M.F., Rea, P.A. und Poole, R.J. (1985) Identification of 3-O-(4-benzoyl)benzoyladenine 5'-triphosphate- and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding subunits of a higher plant H⁺-translocating tonoplast ATPase. *J. Biol. Chem.* **260**:12273-12279

Manolson, M.F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B.E., Roberts, B.T., Hoyt, M.A. und Jones, E.W. (1994) *STV1* gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p. *J. Biol. Chem.* **269**, 14064-14074

Marienfeld, S., Uhlemann, E.M., Schmid, R., Krämer, R. und Burkovski, A. (1997) Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 291-297

Márquez, J.A. und Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* **382**: 89-92

Measures, J.C. (1975) Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. *Nature* **257**: 398-400

Messenguy, F., Colin, D. und ten Have, J. (1980) Regulation of compartmentation of amino pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* **108**: 439-447

Mironov, V.N., Chikindas, M.L., Kraev, A.S., Stepanov, A.I. und Skryabin, K.G. (1990) Operon organization of genes of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Dok. Akad. Nauk. SSSR* **312**: 237-240

Mitchell, P. (1967) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* **41**: 445-502

Mitchell, P. (1979) Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Trans. Biochem. Soc.* **4**: 399-430

Monschau, N. (1998) Untersuchungen zur Biosynthese von Glycin als Vorstufe von Riboflavin in *Ashbya gossypii*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Monschau, N., Sahm, H. und Stahmann K.-P. (1998) Threonine Aldolase Overexpression plus Threonine Supplementation Enhanced Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4283-4290

Neiman, A.M. (1998) Prospore Membrane Formation Defines a Developmentally Regulated Branch of the Secretory Pathway in Yeast. J. Cell Biol. **140**: 29 - 37

Nelson, H. und Nelson, N. (1990) Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H(+)-ATPase causes conditional lethality. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **87**: 3503-3507

Nelson, H., Mandiyan, S. und Nelson, N. (1989) A conserved gene encoding the 57-kDa subunit of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. J. Biol. Chem. **264**: 1775-1778

Nelson, H., und Nelson, N. (1989) The progenitor of ATP synthases was closely related to the current vacuolar H⁺-ATPase. FEBS Lett. **247**: 147 - 153

Nelson, N. und Taiz, L. (1989) The evolution of H⁺-ATPases. Trends Biochem. Sci. **14**: 113-116

Nicholls, D.G. und Ferguson, S.J. (1992) Harcourt, Brace, Jovanovich (Eds.) Bioenergetics. Academic Press, New York, London

Norkrans, B. und Kylin, A (1969) Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. J. Bacteriol. **100**: 836-845

Nothwehr, S.F. und Stevens, T.H. (1994) Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. J. Biol. Chem. **269**: 10185-10188

Ohsumi Y. und Anraku, Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **156**: 2079 - 2082

Okros, I. (1968) Digitonin reaction in electron microscopy. Histochemie **13**: 91-96

Oliveira, R.P., Lages, F. und Lucas, C. (1996) Isolation and characterisation of mutants from the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila* defective in H⁺/ glycerol symport activity. FEMS Microbiol. Lett. **142**: 147-153

Özbas, T und Kutsal, T. (1986) Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyi* and *Ashbya gossypii*. Enzyme Microb. Technol. **8**: 593-596

Özbas, T und Kutsal, T. (1992) Oxygen transfer kinetics of riboflavin fermentation by *Ashbya gossypii* in agitated fermentors. Enzyme Microb. Technol. **14**: 984-990

Pallotta, M.L., Brizio, C., Fratiani, A., de Virgilio, C., Barile, M. und Passarella, S. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria can synthesise FMN and FAD from externally added riboflavin and export them to the extramitochondrial phase. FEBS Lett. **428**: 245-249

- Perkins, J.B. und Pero, J.G. (1993)** Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. und Losick, R. (Eds.), Biosynthesis of Riboflavin, Biotin, Folic Acid, and Cobalamin. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C., S. 319-334
- Perl, M., Kearney, E.B. und Singer, T.P. (1976)** Transport of riboflavin into yeast cells. J. Biol. Chem. **251**: 3221-3228
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1996)** Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. J Bacteriol **178**: 5229-34
- Peterson, C.A. (1979)** Selective vital staining of companion cells of potato tuber and parsnip root with neutral red. Stain Technol. **54**: 135-139
- Poolman, B. und Glaasker, E. (1998)** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. Mol. Microbiol. **29**: 397-407
- Preston, R.A., Murphy, R.F., und Jones, E.W. (1989)** Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 7027-7031
- Prillinger, Hl, Schweigkofler, W., Breitenbach, M., Briza, M., Staudacher, F., Lopandic, K., Molnar, O., Weigang, F., Ibi, M. und Ellinger, A. (1997)** Phytopathogenic Filamentous (*Ashbya*, *Eremothecium*) and Dimorphic Fungi (*Holleya*, *Nematospora*) with Needle-shaped Ascospores as New Members Within the Saccaromycetaceae. Yeast **13**: 945-960
- Pugin., A. und Guern, J. (1996)** Mode of action of elicitors: involvement of plasma membrane functions. Life sciences **319**: 1055-1061
- Ram, D., Tulsiani, P. und Tonsler, O. (1978)** alpha-D-Mannosidase from Golgi membranes of rat liver. Methods. Enzymol. **50**: 500 - 505
- Randall, S.K. und Sze, H. (1986)** Properties of the partially purified tonoplast H⁺-pumping ATPase from oat roots. J. Biol. Chem. **261**: 1364-1371
- Rao, R. und Slayman, C.W. (1996)** Plasma-membrane and related ATPases. In: Brambl, Marzluf (Eds.) The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology. Springer, Berlin-Heidelber, 1996
- Rengpipat, S., Lowe, S.E. und Zeikus, J.G. (1988)** Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetohylicus*. J. Bacteriol. **170**: 3065-3071
- Reynolds, E.S. (1963)** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**: 208
- Riezman, H. (1985)** Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. Cell **40**: 1001-1009

- Roos, W. (1993)** Transportprozesse und Kompartimentierung. In: Weber, H. (Ed.) Allgemeine Mykologie. Gustav Fischer Verlag Jena - Stuttgart, S. 170-204
- Roos, W., Schulze, R. und Steighardt, J. (1997)** Dynamic compartmentation of vacuolar amino acids in *Penicillium cyclopium*. J. Biol. Chem. **272**: 15894 - 15855
- Rottenberg, H. (1979)** The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. Methods Enzymol. **55**: 547-569
- Rouquie, D., Peltier, J.B., Marquis-Mansion, M., Tournaire, C., Doumas, P., Rossignol und M. (1997)** Construction of a directory of tobacco plasma membrane proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. Electrophoresis **18**: 654-660
- Russo, P. (1995)** *Saccharomyces cerevisiae* mRNA 3' end forming signals are also involved in transcription termination. Yeast **11**: 447-453.
- Said, H.M., Hollander, D. und Mhammadkhani, R. (1993)** Uptake of riboflavin by intestinal basolateral membrane vesicles: a specialized carrier-mediated process. Biochim. Biophys. Acta **1148**: 263-268
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen S. und Coulson, R. (1977)** DNA Sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J.E., Hochuli, M., Szyperski, T. und Wuthrich, K. (1997)** Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. Nat. Biotechnol. **15**:448-452
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. **166**: 368-379
- Schimz, K.L., Rütten, B. und Tretter, M. (1981)** Determination of adenosine nucleotides with luciferin/ luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. Adv. Biotechnol. **1**: 457-462
- Schmidt, G., Stahmann, K.-P., Kaesler, B. und Sahm, H. (1996)** Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. Microbiology **142**: 419 - 426
- Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J.B. (1986)** Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sibirnyi, A.A., Shavlovskii, G.M., Ksheminskaia, G.P., Orlovskaja, A.G. (1977)** Active transport of riboflavin in the yeast *Pichia guilliermondii*. Detection and some properties of the cryptic riboflavin permease. Biokhimiia. **42**:1841-51

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85
- Southern, E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stack, J.H., Horazdovsky, B. und Emr, S.D. (1995)** Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 1-33
- Stahmann, K.-P., Kupp, C., Feldmann, S.D. und Sahm, H. (1994)** Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin-producing fungus *Ashbya gossypii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 121-127
- Steens, H., Maring, J.G., Meijer, D.K. (1993)** Differential effect of metabolic inhibitors on cellular and mitochondrial uptake of organic cations in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 809-818
- Steiner, S. (1991)** Expressionsstudien im filamentösen Pilz *Ashbya gossypii* unter Verwendung von Signalsequenzen des TEF-Gens. Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Steiner, S. und Philippsen, P. (1994)** Sequence and promotor analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 263-271
- Steiner, S., Wendland, J., Wright, M.C. und Philippsen, P. (1995)** Homologous Recombination as the Main Mechanism for DNA Integration and Cause of Rearrangements in the Filamentous Ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* **140**: 973 - 987
- Sternson, L.A., Stobaugh, J.F. und Repta, A.J. (1984)** Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal. Biochem.* **144**: 233-246
- Tokuoka, K. (1993)** Sugar- and salt-tolerant yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 101-110
- Trüper, H.G. und Galinski, E.A. (1986)** Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia* **42**: 1182-1187
- Tunblad-Johansson, I., Andre, L. und Adler, L. (1987)** The sterol and phospholipid composition of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown at various concentrations of NaCl. *Biochim. Biophys. Acta* **921**: 116-123
- Tzagoloff, A., Jang, J., Glerum, D.M. und Wu, M. (1996)** *FLX1* Codes for a Carrier Protein Involved in Maintaining a Proper Balance of Flavin Nucleotides in Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**: 7392-7397

VI. LITERATUR

Uchida, E., Ohsumi Y. und Anraku, Y. (1985) Purification and properties of H⁺-translocating Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyes cerevisiae*. J. Biol. Chem. **260**: 1090-1095

Uchida, E., Ohsumi, Y., und Anraku, Y. (1988) Characterization and function of catalytic subunit alpha of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. A study with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. J. Biol. Chem. **263**, 45-51

Umemoto, N., Ohya, Y. und Anraku, Y. (1991) VMA11, a novel gene that encodes a putative proteolipid, is indispensable for expression of yeast vacuolar membrane H(+)-ATPase activity. J. Biol. Chem. **266**: 24526 - 24532

Van Den Hazel, H.B., Kielland-Brandt, M.C. und Winther, J.R. (1996) Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. Yeast **12**: 1-16

Vandamme, E.J. (1992) Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. J. Chem. Tech. Biotechnol. **53**: 313-327

Vieira, J., und Messing, J.(1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**: 259-268

Vorschrift Multiphor II: Immobiline® DryStrip Kit for 2-D Electrophoresis with Immobiline® DryStrip and ExcelGel™ SDS Instructions (1994) Pharmacia LKB Biotechnolgoy AB, Uppsala, Sweden

Wagner-Jauregg, T. (1974) Riboflavin (Vitamin B₂). In: Ammon, R. und Discherl, W. (Eds.), Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehung dieser Wirkstoffe zueinander. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Band III/ 1, S. 624-656,

Walpole, C.S.J. und Wrigglesworth, R. (1987) Oxido-reductases - Flavoenzymes. In: M.I. Page und Williams, A. (Eds.), Enzyme mechanisms, Belfast University Press, S. 506-533.

Watanabe, Y. und Takakuwa, M. (1987) Change of lipid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* after tranfer to high sodium chloride culture medium. J. Ferm. Technol. **65**: 365-369

Weiss, R.L. (1973) Intracellular localization of arginine and ornithine pools in *Neurospora*. J. Biol. Chem. **248**: 5409-5413

Wells, X.E. und Lees, E.M. (1991) Ureidoglycolate amidohydrolase from developing French bean fruits (*Phaseolus vulgaris* [L.]). Arch. Biochem. Biophys. **287**: 151-159

Wendisch, V.F., de Graaf, A.A. und Sahm, H. (1997) Accurate determination of ¹³C enrichments in nonprotonated carbon atoms of isotopically enriched amino acids by ¹H nuclear magnetic resonance. Anal Biochem **245**: 196 - 202

- Wethered, J.M. und Jennings, D.H. (1985)** Major solutes contributing to solute potential of *Thraustochytrium aureum* and *T. Roseum* after growth in media of different salinities. Trans. Br. Mycol. Soc. **85**: 439-446
- Wickerham, L.J., Flickinger, M.H. und Johnston, R.M. (1946)** The Production of Riboflavin by *Ashbya gossypii*. Arch. Biochem. **9**: 95-98
- Wright, M. und Philippsen, P. (1991)** Replicative transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* with plasmids containing *Saccaromyces cerevisiae* ARS elements. Gene **109**: 99-105
- Xie, X.S. und Stone, D.K. (1986)** Isolation and reconstitution of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex. J. Biol. Chem. **261**: 2492-2495
- Yagi, T. (1988)** Intracellular levels of glycerol necessary for initiation of growth under salt-stressed conditions in a salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. FEMS Microbiol. Lett. **49**: 25-30
- Yanagawa, N., Jo, O.D. und Said, H.M. (1997)** Riboflavin transport by rabbit renal brush border membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta **1330**: 172-178
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. und Messing, J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**: 103-119
- Zerez, C.R., Weiss, R.L., Franklin, C. und Bowman, B.J. (1986)** The properties of arginine transport in vacuolar membrane vesicles of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. **261**: 8877-8882
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D.M., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. und Daum, G. (1991)** Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **173**: 2026-2034

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

C. Förster, S. Marienfeld, R. Wilhelm und R. Krämer (1997) Monitoring riboflavin fluxes across the vacuolar membrane of *Ashbya gossypii* by selective permeabilization of the plasma membrane. Med. Fac. Landbouww. Gent **62**: 1245 - 1248

C. Förster, S. Marienfeld, V. F. Wendisch und R. Krämer (1998) Adaptation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* to hyperosmotic stress: different osmoresponse to NaCl and mannitol stress. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 219 - 226

C. Förster, S. Marienfeld, R. Wilhelm und R. Krämer (1998) Organell purification and selective permeabilisation of the plasma membrane: two different approaches to vacuoles of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. FEMS Microbiol. Lett. **167**: 209 - 214

C. Förster, S. Ruffert, M.A. Santos, R. Krämer und J.L. Revuelta (1998) Physiological consequence of disruption of the *VMA1*-gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. J. Biol. Chem., zur Veröffentlichung akzeptiert.

C. Förster, M.A. Santos, O. Zelder, J.L. Revuelta und R. Krämer (1998)
Organismen zur extrazellulären Herstellung von Riboflavin. Patent DE 19839567.1

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich, am Institut für Biochemie der Universität zu Köln und am Departamento de Microbiología y Genética der Universität Salamanca, Spanien, durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben. Insbesondere gilt mein Dank:

Prof. Dr. R. Krämer für die Überlassung des Themas, für die engagierte Betreuung, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, für viele wertvolle Ratschläge und seine unverwechselbare Art der Motivation - hart aber herzlich.

Dem Referenten PD Dr. W. Müller für seine langjährige Begleitung und stete Unterstützung während der gesamten Biochemie-Ausbildung.

Prof. Dr. H. Sahm für die freundliche Aufnahme im Institut für Biotechnologie des FZ Jülich und sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. J. Revuelta y Dr^a. M^a. Santos un agradecimiento por introducirme en las misterias de la biología molecular.

Ich danke den Wissenschaftlern der BASF AG, Dr. O. Zelder, Dr. H. Althöfer, Dr. M. Pompejus und Dr. H. Seulberger für viele wertvolle Hinweise und Diskussionsideen.

Dr. P. Stahmann und dem Rest der Jülicher Pilzgruppe für konstruktive Kritik, tatkräftige Unterstützung und experimentelle Hilfe, ohne die das Etablieren der Pilzforschung im Bakterien- und Endosymbiontenlager erheblich schwerer gewesen wäre.

Meinen Kooperationspartnern Dr. R. Wilhelm (Fluoreszenzmikroskopie), Dr. V. Wendisch (NMR) und Dr. S. Marienfeld (Elektronenmikroskopie) für den Zugang zu elaborierteren Methoden, die von der Spezies *gemeiner Biochemiker* nicht ohne weiteres zu nutzen sind.

Den Mitarbeitern der Institute in Jülich und Köln (insb. des Fotolabors und der Computertechnik hier und da) bin ich für die vielen kleinen und großen Hilfen sehr verbunden.

Meinen Jülicher Kollegen Dr. S. Six, Dr. R. Siewe, Dr. H. Peter, L. Raeven, H. Paschold, B. Weil und Lotti für das meist freundliche Arbeitsklima und die gewährte Hilfsbereitschaft.

Meinen Kölner Kollegen, insbesondere Dr. S. Ruffert, Dr. A. Schroers, Dr. S. Morbach, Dr. T. Hermann, Birgit Haier, Francois Deuber, Dr. A. Burkovski, Dr. M. Massow und Andrea Meinhardt für Beiträge zur Gestaltung meiner Arbeit und meines Privatlebens.

Meinen Eltern für Unterstützung und Vertrauen in meine Entscheidungen in Unkenntnis der Sachlage.

Stephan für die Erstellung der EM-Bilder mit und ohne (Osmo-)streß, für die ungezählten Phasenkontrastaufnahmen der Hyphen und ihrer Organellen von allen Seiten, für tragende Ideen im Osmoprojekt, für viele andere maßgebliche Ideen, für die Unterstützung beim „Paperschreiben“, für das unermüdliche Korrekturlesen der überaus rohen Rohversionen dieser Arbeit, und für Geduld, mehr Geduld und noch viel mehr Geduld und unerbittlich kritische wie aufmunternde Worte...

Sollte ich noch jemanden vergessen haben, sei auch diesem für seinen Beitrag gedankt.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3626
Januar 1999
ISSN 0944-2952